

**Synthese von neuartigen, Disulfid-verknüpften,
bioabbaubaren Polyethylenglykol-Polyethylenimin-
Copolymeren zur Anwendung in der Gentherapie**

Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nan Zhao
Aus Jilin (China)

Marburg/Lahn 2010

Die vorliegende Arbeit
entstand auf Anregung und unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Thomas Kissel
am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Philipps-Universität Marburg

Meiner Familie
In Liebe und Dankbarkeit

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Kissel für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung, die Betreuung meiner Doktorarbeit und sein in mich gesetztes Vertrauen. Seine unermündliche Anregung, Motivation und die stete Diskussionsbereitschaft hat mir ermöglicht diese Arbeit zu schaffen.

Prof. Dr. Udo Bakowsky danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Kollegen in der Arbeitskreis danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, das Verständnis der verschiedenen Kultur zwischen uns und die stete Hilfsbereitschaft während der gesamten Arbeit.

Frau Julia Michaelis danke ich für die reibungslose Abwicklung der organisatorischen Dinge, Herrn Klaus Keim für die stets zügige Bestellung von Chemikalien und Eva Mohr für die Hilfe bei der Lieferung des Laborbedarfs.

Bei Dr. Regina Reul bedanke ich mich für die Einführung in die Arbeitsgruppe und die sinnvolle Vorschläge während der Arbeit.

Für die Hilfe beim Erlernen neuer Geräte danke ich meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Dr. Nina Seidel, Dr. Oliver Germershaus, Dr. Xiaoying Wang, Dr. Terry Steele, Dr. Sascha Maretschek, Dr. Olivia Merke, Frank Morell, Nadja Bege, Tobias Lebhardt, Moritz Beck-Brochsitter, Heiko Debus. Mit denen zusammen danke ich Dr. Juliane Nguyen, Dr. Cuifang Cai, Dr. Erik Rytting, Christoph Schweiger, Markus Benfer, Thomas Renette, Olga Samsonova, meinen Bürokollegen Dr. Yu Liu, Thomas Endres und den Mitgliedern aus dem Arbeitskreis von Prof. Bakowsky für die schöne gemeinsame Zeit.

Besonderer Dank gilt Susanne Rösler, Thomas Endres, Moritz Beck-Brochsitter und Christoph Schweiger für die sorgfältige Korrektur der Dissertation.

Susanne Rösler danke ich noch für die angenehme, erfolgreiche Zusammenarbeit, die ausführliche Diskussion.

Weiterhin gilt mein Dank Thomas Betz aus dem Arbeitskreis von Prof. Bakowsky, der mit Zeitaufwand die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen durchführte.

Für die zahlreichen spektroskopischen und spektrometrischen Messungen danke ich den analytischen Abteilungen des Fachbereichs.

An dieser Stelle möchte ich meinen liebevollen Eltern für ihre stete Unterstützung und ihr Verständnis für alle meine Entscheidungen danken.

Zuletzt, doch am allermeisten, danke ich meinem Mann Dong Sun von ganzen Herzen, der mich die ganze Zeit über unterstützt hat, um diese Arbeit zu verwirklichen.

Inhaltverhältnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Gentherapie.....	1
1.1.1 Nicht-viraler Gentransfer.....	1
1.1.2 Polykationische Vektoren.....	2
1.1.3 Transfektion mit Polyplexe (Polyfektion).....	4
1.2 Polyethylenimin-basierende kationische Genvektoren.....	5
1.2.1 Polyethylenimine.....	5
1.2.2 PEG-PEI-Copolymere.....	8
1.2.3 Bioabbaubare über Disulfid-Brücken verknüpfte PEI-Derivate.....	9
1.3 Polymer Chemie.....	11
1.3.1 Blockcopolymere.....	11
1.3.2 Click-Chemie.....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
 2. Materialien und Methoden.....	 18
2.1 Materialien.....	18
2.2 Charakterisierungsmethoden.....	18
2.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	18
2.2.2 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC).....	19
2.2.3 Infrarotspektroskopie (IR).....	20
2.2.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	20
2.2.5 UV-Spektrometer.....	20
2.2.6 Quantifizierung des Polymers über Cu-Assay.....	20
2.2.7 Bestimmung des Thiol-Gehalts mittels Ellman's Reagenz.....	21
2.3 Abbauntersuchung mit DTT.....	21
2.3.1 PEI-SS-PEI.....	21

2.3.2 PEI-PEG-SS-PEG-PEI.....	22
2.4 Komplexierung mit DNA.....	22
2.5 Größe und Zetapotenzial.....	23
2.6 Gelelektrophorese.....	23
2.7 Morphologie der Polyplexe (AFM).....	24
2.8 Messungen der Cytotoxizität über MTT-Assay.....	24
2.9 Transfektion.....	25
 3 Ergebnisse und Diskussion.....	 26
3.1 Polymersynthese und Charakterisierung.....	26
3.1.1 Synthese von bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit SMPT.....	26
3.1.1.1 Synthese von HS-PEG-SH.....	26
3.1.1.2 Modifizierung von linearem Polyethylenimin mit SMPT.....	28
3.1.1.3 Copolymerisation von PEG-PEI mit SMPT.....	33
3.1.2 Synthese von bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit bifunktionalen PEGhaltigen Linkers.....	36
3.1.2.1 Blockcopolymerisation von PEG-PEI durch Bildung eines Amids.....	37
3.1.2.1.1 Polymerisation mit Linker SAT(PEO) ₄	37
3.1.2.1.2 Polymerisation mit Linker AcS-PEG-COOH.....	42
3.1.2.2 Blockcopolymerisation von PEG-PEI durch Reduktion von Imin.....	47
3.1.2.2.1 Polymerisation mit AcS(PEO) ₃ CH ₂ CHO.....	48
3.1.2.2.2 Polymerisation mit (OHCCH ₂ (PEO) ₃ S) ₂	51
3.1.2.3 Polymerisation mit (TsO(PEO) ₄ S) ₂	53
3.1.3 Synthese eines bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymers durch Kupplung mittels Click-Chemie.....	55
3.1.3.1 Synthese von Disulfid-Brücken enthaltenden Polyethylenimin	

durch Kupplung mit Click-Chemie.....	56
3.1.3.1.1 Synthese von PEI-SS-PEI über Click-Chemie mit Linker A.....	56
3.1.3.1.2 Synthese von PEI-SS-PEI über Click-Chemie mit Linker B.....	62
3.1.3.2 Synthese von Disulfid-Brücken enthaltendem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit Click-Chemie.....	64
3.2 Beurteilung des Polymers als Carrier für die Gentherapie.....	68
3.2.1 Untersuchung der Abbaubarkeit.....	68
3.2.1.1 Abbau von PEI-SS-PEI mit DTT.....	68
3.2.1.2 Abbau von PEI-PEG-SS-PEG-PEI mit DTT.....	69
3.2.2 Komplexierung mit DNA und Charakterisierung über Gelelektrophorese.....	70
3.2.3 Größe und Zeta-Potential der Polyplexe.....	72
3.2.4 Untersuchung der Morphologie über AFM.....	74
3.2.5 Zytotoxizität.....	75
3.2.6 Transfektion.....	76
4. Experimenteller Teil.....	81
4.1 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit SMPT.....	81
4.1.1 Darstellung von TsO-PEG-OTs.....	81
4.1.2 Darstellung von AcS-PEG-SAc.....	81
4.1.3 Darstellung von HS-PEG-SH.....	82
4.1.4 Modifizierung von linearem PEI 2500 mit SMPT.....	83
4.1.5 Copolymerisation von PEG-PEI durch Kupplung mit SMPT.....	84
4.2 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit SAT(PEO) ₄	85
4.2.1 Darstellung von HO(PEO) ₅ COONBu.....	85

4.2.2 Darstellung von HO(PEO) ₅ COOtBu.....	86
4.2.3 Darstellung von TsO(PEO) ₅ COOtBu.....	86
4.2.4 Darstellung von Br(PEO) ₅ COOtBu.....	87
4.2.5 Darstellung von Br(PEO) ₅ COOH.....	88
4.2.6 Darstellung von AcS(PEO) ₅ COOtBu.....	88
4.2.7 Darstellung von AcS(PEO) ₅ COOH ausgehend von Br(PEO) ₅ COOH..	89
4.2.8 Darstellung von AcS(PEO) ₅ COOH ausgehend von AcS(PEO) ₅ COOtBu.....	90
4.2.9 Darstellung von TsO(PEO) ₄ OH.....	90
4.2.10 Darstellung von AcS(PEO) ₄ OH.....	91
4.2.11 Darstellung von AcS(PEO) ₃ CH ₂ CHO.....	92
4.2.12 Darstellung von (HO(PEO) ₄ S) ₂	93
4.2.13 Darstellung von (OHCCH ₂ (PEO) ₃ S) ₂	93
4.2.14 Darstellung von HO(PEO) ₄ CH ₂ COOtBu.....	94
4.2.15 Darstellung von Br(PEO) ₄ CH ₂ COOH.....	95
4.2.16 Darstellung von AcS (PEO) ₄ CH ₂ COOH.....	95
4.2.17 Darstellung von HO(PEO) ₄ CH ₂ CH=CH ₂	96
4.2.18 Darstellung von tBuOOCCH ₂ (PEO) ₄ CH ₂ CH=CH ₂	97
4.2.19 Darstellung von (TsO(PEO) ₄ S) ₂	97
4.2.20 PEG-PEI-Copolymerisation mit SAT(PEO) ₄	98
4.2.21 PEG-PEI-Copolymerisation mit AcS(PEO) ₅ COOH.....	99
4.2.22 PEG-PEI-Copolymerisation mit AcS(PEO) ₃ CH ₂ CHO.....	100
4.2.23 PEG-PEI-Copolymerisation mit Linker (OHCCH ₂ (PEO) ₃ S) ₂	101
4.2.24 PEG-PEI-Copolymerisation mit Linker (TsO(PEO) ₄ S) ₂	101
4.3 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Koppelung mittels Click-Chemie.....	102
4.3.1 Darstellung von N ₃ (PEO) ₄ OH.....	102
4.3.2 Darstellung von N ₃ (PEO) ₄ OTs.....	102
4.3.3 Darstellung von N ₃ (PEO) ₄ SAc.....	103

4.3.4 Darstellung von $(N_3(PEO)_4S)_2$ ausgehend von $N_3(PEO)_4SAc$	104
4.3.5 Darstellung von $(HO(PEO)_4S)_2$	104
4.3.6 Darstellung von $(N_3(PEO)_4S)_2$ ausgehend von $(TsO(PEO)_4S)_2$	105
4.3.7 Bis-Acylierung von Cystamin mit Chloracetylchlorid.....	106
4.3.8 Darstellung von mit Azidoacetamid modifiziertem Cystamin.....	106
4.3.9 Bis-Acylierung von Cystamin mit 3-Chloropropanoylchlorid.....	107
4.3.10 Darstellung von 3-Azidopropanamid modifiziertem Cystamin.....	108
4.3.11 Modifizierung von Polyethylenimin mit Propargylbromid.....	109
4.3.12 Polymerisation von alkin-modifiziertem PEI durch Kupplung mit dem azidoacetamid-modifizierten Cystamin.....	109
4.3.13 Polymerisation von alkin-modifiziertem PEI durch Kupplung mit dem 3-azidopropanamid-modifizierten Cystamin.....	110
4.3.14 Synthese von mit 1,2,3-Triazol verknüpftem, disulfidhaltigem PEG-PEI-Copolymer.....	111
 5. Zusammenfassung und Ausblick.....	 112
Summary and outlook.....	112
5.1 Zusammenfassung.....	112
5.2 Ausblick.....	116
5.3 Summary.....	117
5.4 Outlook.....	121
 6. Anhang.....	 123
6.1 Literatur.....	123
6.2 Abkürzung.....	135
6.3 Liste der Publikation.....	136

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Gentherapie

In den letzten Jahren wurde die Gentherapie als eine entwicklungsfähige Methode zur Behandlung vieler menschlicher Erkrankungen, z.B. Zystische Fibrose [1-3], Hämophilie, erworbenes Immundefektsyndrom (AIDS) [4] und vielfältigste Stoffwechselstörungen [5], welche auf angeborene oder erworbene Defekte des menschlichen Genoms zurückgeführt werden, betrachtet und intensiv beforscht. Die Gentherapie liefert eine Möglichkeit, Krankheiten nicht symptomatisch zu behandeln, sondern die Ursache der Erkrankung zu beheben. Der Ersatz der defekten Gene in den erkrankten Zellen verhindert den Eingriff in die Keimbahn. Dieser Prozess wird als somatische Gentherapie bezeichnet.

1.1.1 Nicht-viraler Gentransfer

Das Einschleusen des genetischen Materials (DNA, verschiedene RNAs) in die betroffenen Zellen ist ein entscheidendes Problem der Gentherapie. ‚Nackte‘ Nukleinsäuren können auf der einen Seite wegen ihrer Größe und Ladung meist nicht ohne Hilfsmittel in Zellen gelangen, wie die Zellenmembran ein erhebliches Hindernis für den Übertritt anionischer Nukleinsäure darstellt. Auf der anderen Seite ist sie nicht stabil unter *in vivo* Bedingungen und somit wird sie nach der Zellaufnahme durch Nukleasen rasch abgebaut. Daher bedarf es geeigneter ‚Genvektoren‘, die die Übertragung der Nukleinsäure in die betroffenen Zellen ermöglichen und vor einem enzymatischen Angriff in den Lysosomen schützen. Somit ermöglichen sie das Einbringen der Nukleinsäure in die Zellen und deren Zellkern.

Die verschiedenen Genvektoren lassen sich in virale und nicht-virale Vektoren

einteilen. Virale Vektoren, z.B. Adenoviren, Retroviren, Adeno-assoziierte Viren, bei denen die virale Komponente gegen das therapeutische Gen ausgetauscht wird, werden häufig in klinischen Studien eingesetzt, da sie sich durch die Eigenschaft auszeichnen, sich in Wirtszellen einzuschleusen und somit hohe Transfektionseffizienz erreichen zu können. Allerdings besitzen die viralen Vektoren nach der Applikation Nachteile wie die Immunogenität und die insertionelle Mutagenese, welche zusätzliche Gefahren für die Patienten darstellen können [6, 7]. Außerdem wird die Kapazität des viralen Gentransfers auf seine Größe eingeschränkt, und die Massenproduktion der viralen Vektoren ist auch schwierig zu ermöglichen. Aus diesen Gründen gewannen nicht-virale Vektoren im Laufe des letzten Jahrzehntes wegen ihrer Sicherheit und geringen Immunogenität an Bedeutung.

Zusammenfassend sollte ein optimaler Genvektor folgende Eigenschaften, wie z.B. geringe Toxizität und Immunogenität, keine Interaktion mit Serumbestandteilen, hohe Effizienz und Selektivität für den Gentransfer in die Zielzellen, steuerbare Genexpression über regulierbare Promotoren, sowie reproduzierbares und kostengünstiges Herstellungsverfahren, aufweisen [8]. Der ideale Vektor ist bisher allerdings noch nicht entwickelt worden.

1.1.2 Polykationische Vektoren

Zu den nicht-viralen Genvektoren gehören kationische Lipide und kationische Polymere. Davon werden kationische Liposomen zurzeit am häufigsten für den Gentransfer eingesetzt, da sie geringe Toxizität, hohe Variabilität und geringe Antigenizität im Vergleich zu viralen Vektoren besitzen [9-11]. Zusätzliche Vorteile der Liposomen sind ihre relativ einfache Synthese, die variable Größe (30 nm bis 10^4 nm) und ihre steuerbare Zusammensetzung, wodurch sich Eigenschaften wie Oberflächenladung oder Hydrophobizität anpassen lassen [12-14]. Der Nachteil der Lipide ist ihre geringe Transfereffizienz, da sie im Zytoplasma durch Verschmelzung

mit lysosomalen Vesikeln zum größten Teil abgebaut werden. Ihre Zytotoxizität wurde auch in *in vivo* Studien beobachtet [15, 16].

Verschiedene synthetische und natürliche kationische Polymere sind eine weitere Klasse der nicht-viralen Vektoren. Durch Bildung von Komplexen mit DNA (Polyplexe) wird der Gentransfer (Polyfektion) möglich. Beispielsweise sind Polylysin [17] und Chitosan Vertreter der natürlichen Polymere, während Dendrimere [18], Polyethylenimine (PEI) [19], Poly[2-(Dimethylamino)-Ethyl-Methacrylat] (PDMAEMA) und Poly-b-Aminoester [20] zu den synthetischen Polymeren gehören (siehe Abb. 1).

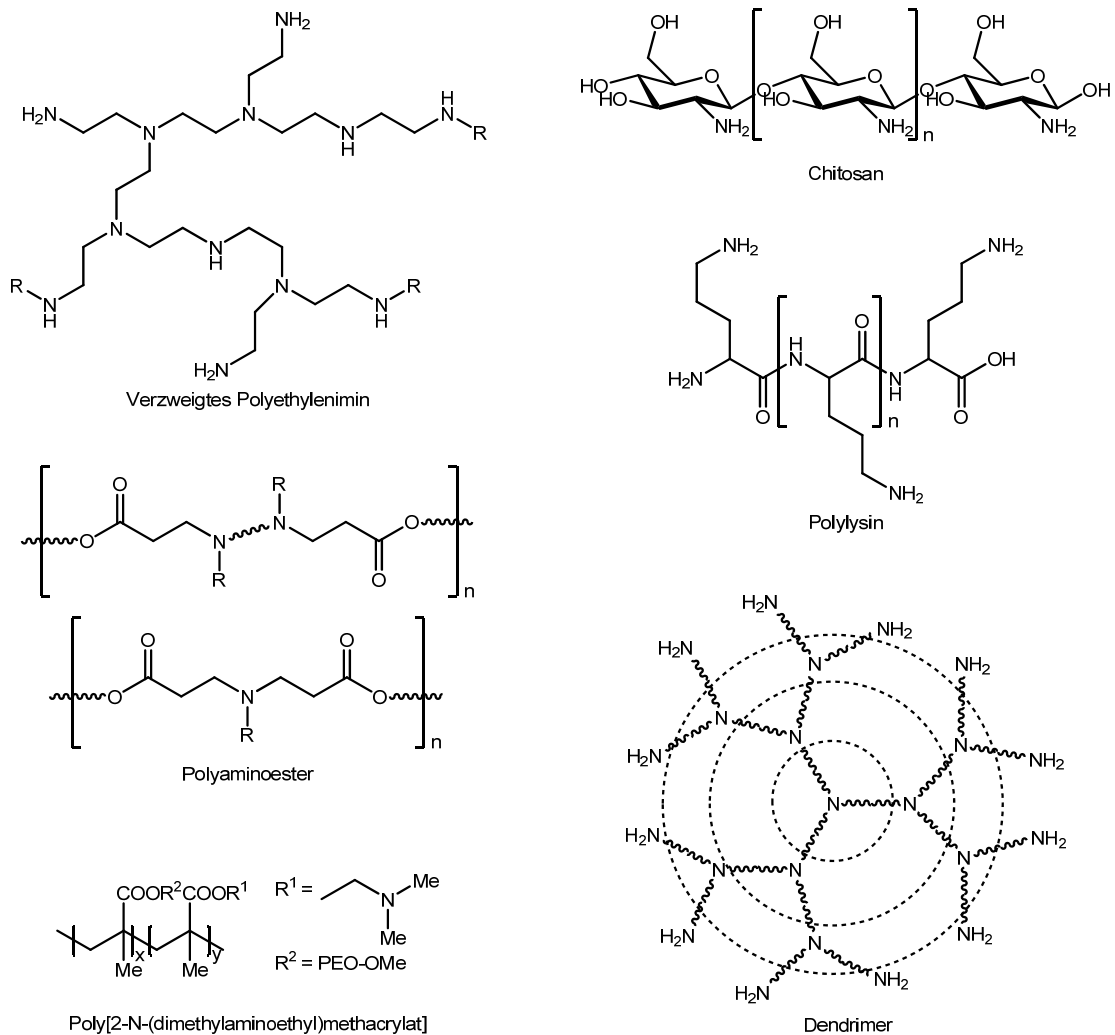


Abb. 1 Strukturformeln häufig verwendeter kationischer Polymere [21].

Ähnlich wie die kationischen Lipide können die kationischen Polymere aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte mit der negativ geladenen DNA je nach Formulierung monodisperse oder polydisperse Polyplexe bilden. Sowohl die Lipoplexe als auch die Polyplexe zeigten in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen ähnlich gute Transfektionseffizienzen, die aber mit denen von viralen Vektoren nicht vergleichbar sind. Es wurde auch berichtet, dass die Anwendung von kationischen Dendrimere, besser zellverträglich sei als die kationische Lipofektion [17-19]. In der vorliegenden Arbeit werden hauptsächlich kationische Polymere als Genvektoren diskutiert.

1.1.3 Transfektion mit Polyplexe (Polyfektion)

Als erfolgreiche Transfektion bezeichnet man eine Reihe verschiedener Prozesse auf zellulärer Ebene (siehe Abb. 2). Die wirksamen Gene müssen als erstens in die Zielzellen eingeschleust wurden. Nach der Kontaktaufnahme in die Zelle wird die DNA durch intrazelluläre Transportwege zum Nukleus gelangen. Gefolgt ist der Transfer der DNA in das Nukleoplasma über die Kernmembran. Im Kern wird DNA zu mRNA transkribiert, die anschließend an den Ribosomen im Zytosol translatiert wird [10]. Die Expression der DNA kann transient (vorübergehend) oder stabil sein. Die Aufnahme und Expression nackter DNA ist nur begrenzt möglich [22, 23]. Da Zellmembranen für polyanionische, hydrophile DNA eine Barriere darstellen [24], ist die Bildung von Lipoplexen (Lipofektion) und Polyplexen (Polyfektion) daher ein wichtiges Verfahren zum Gelingen der Transfektion.

Die Überwindung der Barriere sowie der Transport der DNA in den Zellkern wird durch Bildung der Polyplexe realisiert. Die erste zu überwindende Barriere ist die Zytoplasmamembran. Die positiv geladenen Polyplexe werden durch negativ geladene Proteoglykane (Heparansulfat-Rezeptor) auf der Zelloberfläche über Endosomen internalisiert [25, 26]. Es wird vermutet, dass die nicht protonierten Aminogruppen der Polymere nach erfolgter Aufnahme der Polyplexe über

Endozytose eine osmotische Schwellung verursachen, wodurch die Endosomen zerstört werden, die DNA in das Zytoplasma freigesetzt wird und in den Zellkern gelangen kann [17-19]. So erfolgt die Überwindung der zweiten Barriere, die Endosomenmembran. Die Kernmembran ist die dritte Barriere für den Transport der DNA in den Zellkern. Genaue Analyse und geeignete Methoden zur Überwindung der genannten Barrieren sowie für die Optimierung des DNA-Transports in den Zellkern sind noch zu entwickeln.

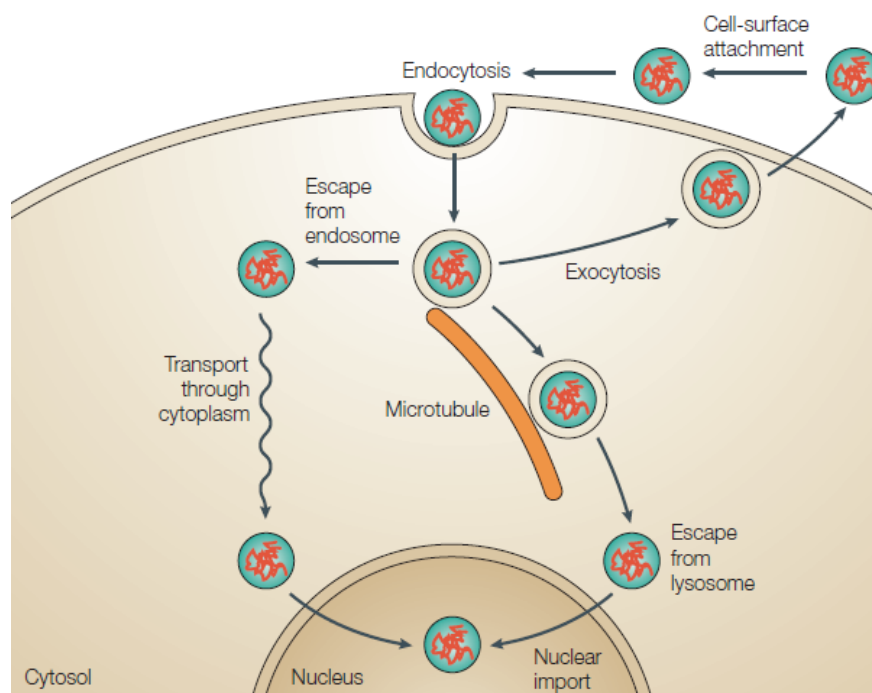


Abb. 2 Übersicht der zu überwindenden Barrieren: die Aufnahme, intrazelluläre Prozessierung und Genexpression der Plasmid/Polykation-Komplexe [27].

1.2 Polyethylenimin-basierende kationische Genvektoren

1.2.1 Polyethylenimine

Das Polyethylenimin ist eines der meist untersuchten kationischen Polymeren, der sogenannte ‚Gold Standard‘, der bereits 1995 zum ersten Mal als Genvektor von Boussif et al. verwendet wurde [19]. PEI kann lineare oder verzweigte Struktur aufweisen. Wegen der hohen positiven Ladungen hat Polyethylenimin die Fähigkeit

DNA, auch wenn sie sehr groß ist, effizient in kugelförmige Partikel bis zum ~100 nm zu komplexieren [28, 29]. Dies ermöglicht die effektive Transfektion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Aufgrund der zahlreichen sekundären und tertiären Amin-Gruppen weist PEI eine hohe Pufferkapazität über einem sehr breiten pH-Bereich im Gegensatz zu den Polymeren, die nur primären Amin-Gruppen enthalten (z.B. Polylysin), auf [30]. Diese hohe Pufferkapazität führt zu einem ‚Proton-Schwamm-Effekt‘ des PEIs (siehe Abb. 4), wodurch eine osmotische Schwellung und somit die gefolgte Zerstörung der Endosomen verursacht wird. Die DNA wird in das Zytoplasma freigesetzt und damit der Transfer der DNA in den Zellkernen ermöglicht (siehe Abb. 3).

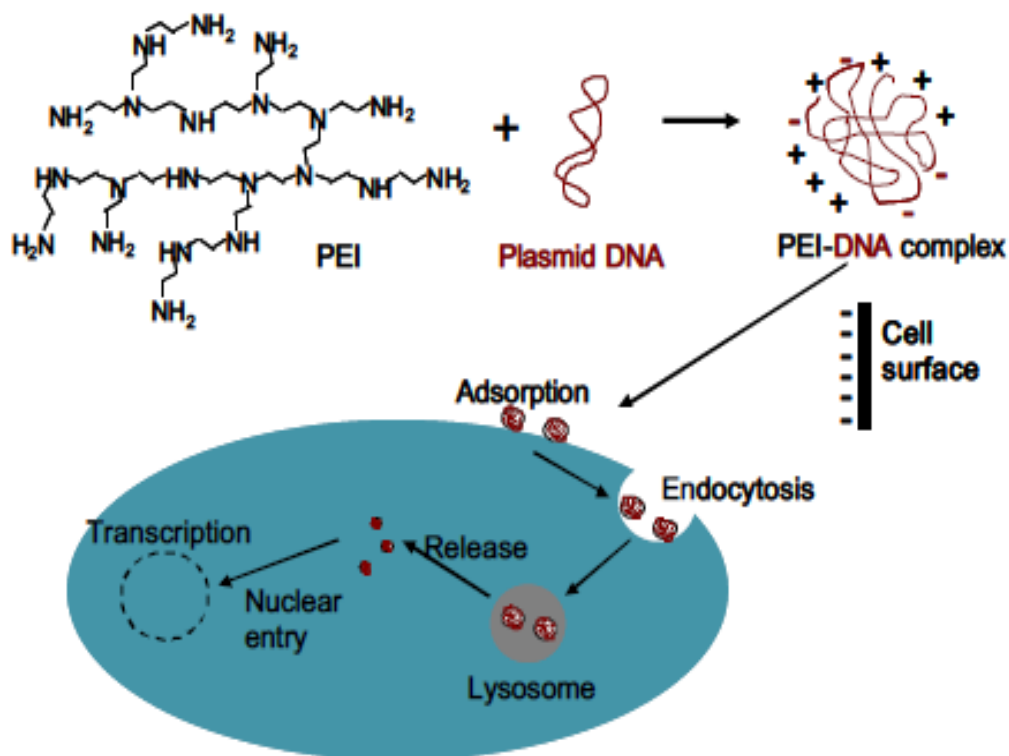


Abb. 3 Übersicht über Zellaufnahme und Transfektionsprozess durch Bildung von Polyplexen mit Polyethylenimin [31].

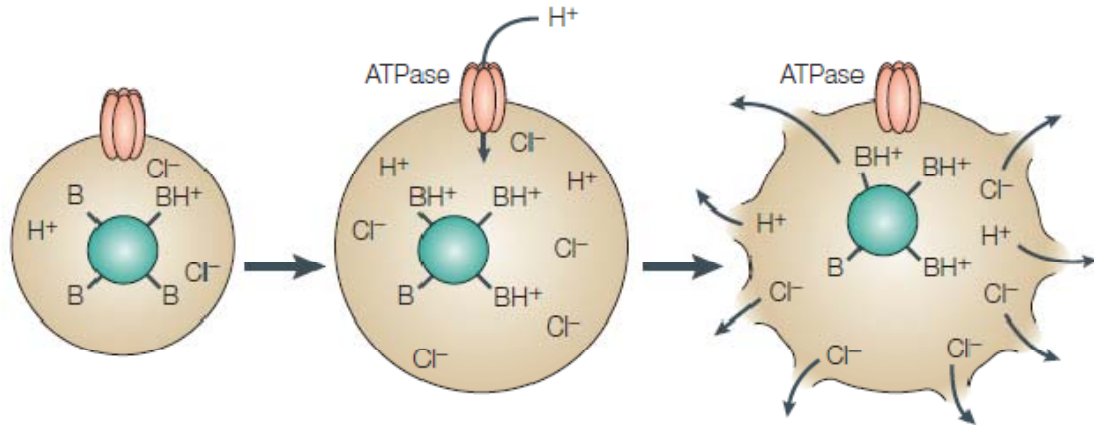


Abb. 4 Schematische Darstellung des ‚Proton-Schwamm‘-Mechanismus. Die Protonierung des Polymers (grün) verursacht einen steigenden Einstrom von Protonen und Gegenionen in das endozytotische Vesikel und somit eine osmotische Schwellung, wodurch die Endosomen zerstört werden [27].

Einige bekannte Parameter, die das Transfektionsverhalten der Polyplexe wie Zellaufnahme, Schutz vor dem Abbau der DNA durch Nukleasen, sowie ihre Transkription beeinflussen können, sind z.B. Partikelgröße und Zetapotential, welche durch Einstellung des Verhältnisses von Stickstoff (N) des Polyethylenimins zum Phosphat (P) der DNA (N/P-Verhältnis) gesteuert werden können. Wesentliche Einflussfaktoren liegen in der Struktur und der entsprechenden Größe des PEIs, was gleichzeitig seine Toxizität beeinflusst. Hochmolekulare Polyethylenimine (z.B. 25 kDa oder 800 kDa, verzweigt) zeigen hohe Transfektionseffizienz, allerdings treten hier auch hohe Toxizitäten auf [32]. Niedermolekulare Polyethylenimine mit Gewichten (z.B. 800Da oder 2kDa, verzweigt) weisen zwar geringere Toxizität, aber ebenso geringere Transfektionseffizienz auf [33].

Als nachteilig wurden die Zytotoxizität des Polyethylenimins *in vitro* durch Zeichen von Zellnekrose sowie Apoptose [34] und *in vivo* über zytotoxische Effekte [35] beobachtet. Die Zytotoxizität, die hauptsächlich von der hohen positiven Ladung des Polyethylenimins verursacht wird, beschränkt seine *in-vivo*-Applikation. Durch Modifizierung der PEI-Strukturen (wie z.B. PEGylieren) kann das Molekulargewicht,

der Verzweigungsgrad sowie die Oberflächenladung gesteuert werden, um die Zytotoxizität zu verringern. Berücksichtigt man noch die Unabbaubarkeit des PEIs, die die langfristige Toxizität im Körper verursacht, ist die Synthese bioabbaubarer PEI oder PEI-Derivaten nötig.

1.2.2 PEG-PEI-Copolymere

Zur Entwicklung effizienter nicht-viralen Vektoren für die Gentherapie wurde das Polyethylenimin weitgehend modifiziert. Dazu gehören Synthesen von Block- oder Pfropf-Copolymere mit kationischen Polymere und hydrophilen nichtionischen Komponenten, welche als Polymeren zweiter Generation betrachtet werden [36]. Eine der meist verwendeten Methoden ist die Kopplung mit Polyethylenglykol (PEG) an PEI. Diese Methode wird als ‚PEGylieren‘ bezeichnet und ist weitgehend als ein wichtiges und alltägliches Verfahren zur Modifizierung der Genvektoren, wie z.B. PEI, Dendrimere [37], Polylysin [38], Liposomen [39] und auch viralen Vektoren [40], verbreitet. Die Strategien zum PEGylieren sind wegen der sehr variablen einzufügenden funktionalen Gruppen an PEG vielfältig [41]. Da die PEG-Blöcke nichtionischen hydrophilen Charakter aufweisen, wird PEGylierung zur Verbesserung der Solubilität und Biokompatibilität sowie Verringerung der Immunogenität beim Gentransfer eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass durch PEGylierung der Polyethylenimine eine erhöhte Solubilität [42] und reduzierte Wechselwirkungen mit Proteinen [43] der Polyplexe erzielt werden konnten. Die Zirkulationszeit der Polyplexe im Blutkreislauf konnten verlängert werden [44]. Die Toxizität *in vitro* und *in vivo* konnte mit PEGylierten PEI ebenfalls verringert werden [45, 46].

Die Komplexierung der DNA mit PEI verändert sich und zeigt in der Regel wenig kompaktere Polyplexe mit größeren Partikelgröße nach der Zugabe des PEG-Blocks wegen der sterischen Abschirmung des geladenen PEIs. Der vom Molekulargewicht abhängige Substitutionsgrad und die Kettenlänge von PEG sind vermutlich Einflussfaktoren auf das Kondensationsverhalten. Es wird berichtet, dass kurze

Seitenkette mit der PEG-Größe zwischen 350 und 1900 Da keinen signifikanten Effekt auf die DNA-Komplexierung zeigte [47]. Mit ansteigender Pfropfdichte von PEG 2 kDa nehmen die Größen der Polyplexe zu [48]. Im Gegensatz dazu bildete ein Diblock-Copolymer, welches nur eine Kette von PEG 20 kDa enthält, kugelförmige Polyplexe vergleichbar mit PEI-Polyplexen. Diese spezielle AB-Struktur mit deutlich getrenntem PEI- und PEG-anteil ist vermutlich dafür verantwortlich [49].

Außerdem zeigen PEG-PEI-Polyplexe geringere Aggregationstendenz *in vitro* [43, 50, 51], und die Oberflächenladung der Polyplexe spielt eine wichtige Rolle für ihr Verhalten *in vivo* [52]. Polyplexe mit einer neutralen Oberflächenladung wirken nur leicht auf Endothelial, Plasma-Protein oder Zellblutbestandteile ein. Dies führt zu einer längeren Halbwertszeit der Polyplexe in Zirkulation [51]. Es wird vermutet, dass PEG eine hydrophile ‚Krone‘ um den PEI/DNA-Kern bildet. So wird das Zeta-Potenzial verringert und somit erfolgt die Stabilisierung der Polyplexe [53]. Zudem konnte die von Salz verursachte Aggregation durch Anwendung des hochmolekularen PEGs (mindestens 2000-5000 Da) herabgesetzt werden. Um den ähnlichen Stabilisierungseffekt zu erzielen, ist ein hoher Substitutionsgrad von kurzzeitigem PEG notwendig [47, 49, 54]. Trotz intensiver Erforschung des Einflusses der PEGylierung auf das *in vivo*/physikochemische Verhalten der Polymere konnten die optimalen Parameter, wie der Substitutionsgrad, die Kettenlänge und das Molekulargewicht noch nicht identifiziert werden. Es ist auch erforderlich, bioreversible Verknüpfungen von PEG oder die Anwendung anderer hydrophilen Makromoleküle mit PEI als Alternative von PEG zu entwickeln.

1.2.3 Bioabbaubare über Disulfid-Brücken verknüpfte PEI-Derivate

Die Entwicklung der bioabbaubaren Polykationen basierend auf Polyethylenimin gewinnen als nicht-virale Genvektoren zunehmend an Bedeutung, während die Toxizität des Polyethylenimins die Anwendung *in vitro* und den Einzug in die Klinik beschränkt. Verknüpfungen über Ester- und Amid-Bindungen werden häufig

angewendet, da diese Bindungen hydrolyselabil sind und *in vitro* relativ schnell degradiert werden können [55, 56]. Heutzutage ist die chemische Modifizierung durch Verknüpfung über Disulfid-Brücken eine attraktive Strategie zur Darstellung eines bioabbaubaren Polykations [57], weil Disulfid-Bindungen in reduzierender Umgebung, wie z.B. in Endosomen/Lysosomen [58] oder durch Glutathion [59], spaltbar sind, was zu einer Freisetzung der Nukleinsäure aus den Polyplexe führen kann [59]. Häufig wurden die zwei folgenden Strategien verwendet: Thiol-Oxidierung nach der Polyplex-Bildung [60, 61] oder Verknüpfung über niedermolekulare Reagenzien [62]. Als Beispiel wurde ein über Disulfid-Brücke verknüpft auf PEI 800 Da basierendes nicht-virales Vektorsystem durch Verwendung von Dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP) und Dimethyl-3,3'-Dithiobispropionimide (DTBP) von Gosselin *et al.* synthetisiert [63]. Die dadurch verursachte Gentransfektion erreichte zwei fach weniger hohe Transfektionseffizienz verglichen mit PEI 25 kDa bei gleichzeitig verringerter Toxizität. Die Erhöhung der Transfektionseffizienz im Vergleich zu der von reinem PEI 800 Da ist scheinbar durch Bildung hochmolekularer Aggregate (23-75 kDa) und durch Eliminierung der positiven Ladungen der primären Amine realisiert. Dieses System zeigte auch eine verbesserte Stabilität gegen polyanionische Störungen.

Da das hochmolekulare PEI 25 kDa eine hohe Transfektionseffizienz und gleichzeitig hohe Toxizität zeigt, und das niedermolekulare PEI (< 2 kDa) zwar kaum toxisch aber ineffektiv ist [32, 33], wird vermutet, dass ein aus niedermolekularem PEI bestehendes bioabbaubares Polymer (~25 kDa) gute Transfektionseffizienz und niedrige Toxizität besitzen kann. Durch Verknüpfung von PEI 800 kDa mit niedermolekularem Diacrylat wurden Poly(β -aminoesters) von Forrest *et al.* synthetisiert [64]. Diese bioabbaubaren Polymere haben ähnliche Strukturen, Größe (14-30 kDa) und Komplexierungsfähigkeit für DNA wie PEI 25 kDa, dennoch zeigen sie 2-16 fach höher Transfektionseffizienz als PEI 25 kDa und sind wesentlich untoxischer.

Über Disulfid-Brücken verknüpfte, aus niedermolekularem PEI bestehende PEI bzw. PEG-PEI-Copolymere wurden bisher wenig berichtet, die meistens nicht effektiver als PEI 25 kDa waren (z.B. Polymere von Gosselin et al. [63]). Woodle et al. haben PEI und PEG über SPDP (*N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate) verknüpft und mit einem Peptid-Ligand (RGD) verbunden, um die mögliche, nicht spezifische Wechselwirkung der gebildeten DNA-Polymere *in vivo* zu eliminieren [65]. Wagner et al. haben mit Transferrin (Tf) gekoppelte PEG-SS-PEI synthetisiert, welche in Tumorzellen vergleichbare Transfektionseffizienz wie Tf-PEI 25 kDa erzielen konnten. Diese PEG-PEI-Copolymere besitzen jedoch die Struktur von AB-Block und bestehen aus hochmolekularen PEI (22 kDa & 25 kDa) und PEG (5-40 kDa). Daher sind sie nicht ‚völlig‘ abbaubar [51, 66]. Danach ist es erforderlich ‚völlig‘ bioabbaubare Disulfid-verknüpfte PEG-PEI-Copolymere zu entwickeln.

1.3 Polymerchemie

1.3.1 Blockcopolymere

Blockcopolymere besitzen lineare Anordnung von Blöcken unterschiedlicher Zusammensetzung [67]. Je nach Anzahl der Blöcke spricht man von Diblock-(AB), Triblock-(ABA), Multiblock-(A_nB_m), oder Segment-Copolymeren, deren Enden kovalent miteinander verknüpft sind. Möglich sind noch kompliziertere Architekturen wie sternförmige Blockcopolymere [68] und die Beteiligung weiterer Monomerbausteine C. Der Trend in der Polymerforschung geht heutzutage in die Erforschung und die Synthese von Polymeren mit komplizierteren Architekturen (siehe Abb. 5) .

Blockcopolymere können auf unterschiedliche Art und Weise aufgebaut werden. *Sequentielle Polymerisation*, die die anionisch, kationisch, radikalisch, Gruppen-Transfer- und Ring-Öffnende-Metathese-Polymerisation einschließt, hat den Vorteil, gut definierte Strukturen herzustellen. Der Nachteil ist in ihrem hohen

Anspruch an die Reinheit des Lösungsmittels und des Monomers, sowie die hohe Reaktivität der Initiatoren zu suchen. *Blockcopolymerisation über funktionale Gruppen* liefert meist nur geringe Ausbeuten, da lange Polymerketten die funktionalen Gruppen abschirmen können. Die Methoden, *Wechsel des Polymerisationsmechanismus* und *Verwendung der Polyinitiatoren*, liefern die Möglichkeit, dass die Monomere der unterschiedlichen Blöcke über verschiedenen Mechanismen copolymerisieren. Durch *chemische Modifikation an einem Blockcopolymer* wird ein Blockcopolymer zu einem neuen Blockcopolymer umgewandelt. Diese Polymerisation verläuft oft unter drastischen Bedingungen und meistens unvollständig [67, 69].

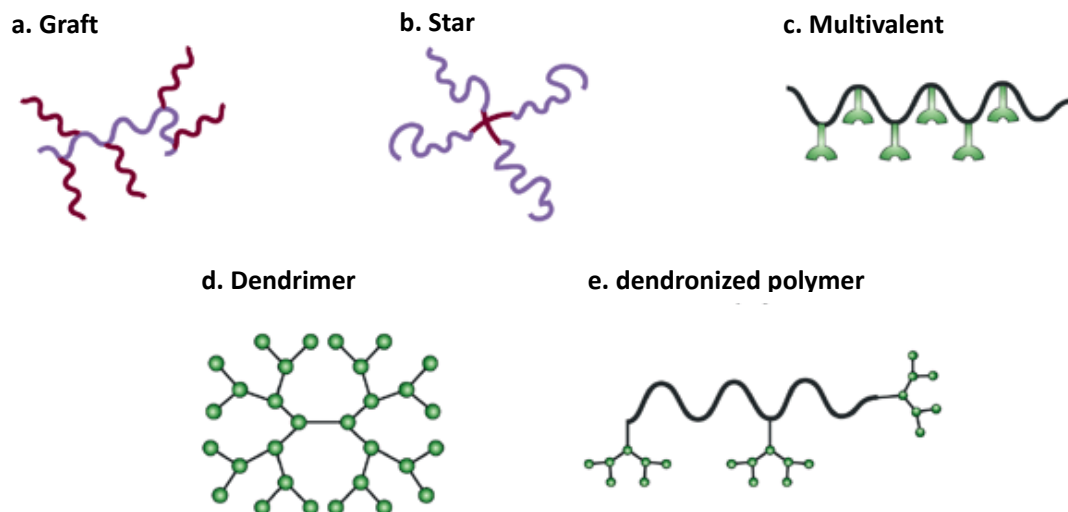


Abb. 5 Neuartige Architekturen von Blockcopolymeren in der Polymertherapie [70].

PEG-PEI-Blockcopolymere mit unterschiedlichem Strukturaufbau werden als potentielle nicht-virale Vektoren im großen Umfang synthetisiert und studiert. Beispielsweise zeigten die aus hochmolekularem PEG und hochmolekularem PEI bestehenden AB- oder ABA-Block-Copolymere effiziente Komplexierungsfähigkeit mit der DNA und verbesserten pharmazeutischen Charakter [71, 72]. Im Vergleich zu niedermolekularem PEI konnten sternförmige PEG-PEI-Copolymer die DNA ebenfalls effizienter kondensieren [68].

1.3.2 Click-Chemie

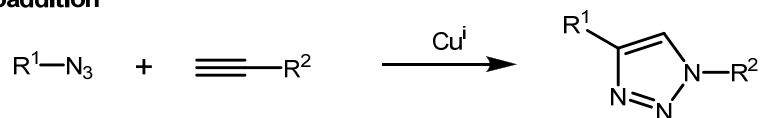
Das Konzept der Click-Chemie wurde 2001 von K. Barry Sharpless begründet und beschreibt eine Möglichkeit, schneller und zielgerichteter Zielmoleküle aus kleineren Einheiten zu synthetisieren als dies die Natur durchführt [73]. Click-Chemie umfasst folgende Vorteile: großer Anwendungsbereich, hohe Ausbeuten, unschädliche Nebenprodukte und Stereospezifität. Des weiteren besitzt die Click-Chemie weitere Vorteile, wie z.B. einfache Reaktionsbedingungen, bereits vorliegende Ausgangsmaterialien und Reagenzien, lösungsmittelfreie Bedingungen oder die Verwendung eines freundlichen Lösungsmittels (z.B. Wasser, oder eines, das leicht entfernbar ist), sowie die einfache Isolierung der Produkte [74]. Click-Chemie gewinnt heutzutage zunehmend an Bedeutung in vielen Forschungsgebieten, wie z.B. Medizin, Chemie und Pharmazie. Ein Grund dafür ist beispielsweise, dass die Click-Chemie eine wichtige Rolle in der Drug-Delivery-Forschung und Nanomedizin spielt. Dies lässt sich damit begründen, dass die Reaktionen in Wasser unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden sollten, damit Biologicals oder andere anfällige Strukturen ihre Funktionalität nicht verlieren. Dafür ist die Click-Chemie sehr gut geeignet und kann alle diese Anforderungen leicht erfüllen [74]. Einige Reviewartikel über Click-Chemie sind bereits schon publiziert [75-77].

Heutzutage werden hauptsächlich folgende vier Sorten Reaktionen als Click-Reaktion zusammengefasst: Cycloaddition, Nucleophile Ring-Öffnung, Carbonyl Chemie des ‚Non-Aldol‘ Typs, und Addition an Kohlenstoff-Mehrfachbindung (siehe Abb. 6). Verwendet wird meistens die Cu^{I} -katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (HDC) von Aziden und Alkinen [78], da die 1,3-dipolare Cycloaddition alle Kriterien der Click-Chemie erfüllen kann und daher viele Vorteile besitzt. Ähnlich wie Click-Chemie anderer Typen führt man die 1,3-dipolare Cycloaddition unter milden Reaktionsbedingungen durch und es entsteht ein regiospezifisches Produkt, das 1,4-substituierte 1,2,3-Triazol. Die Reaktion läuft schnell ab und kann unter einer großen Auswahl von Temperaturen (0-160 °C) und pH-Werten (5-12) durchgeführt

werden. Wegen der unempfindlichkeit des Azids und Alkins werden keine Schutzreaktion oder Entschützungsreaktion gebraucht, was mögliche Nebenreaktionen vermeidet. Die Aufreinigung erfolgt meist durch Filtration mit hohen Ausbeuten [77, 79-81]. Einige andere Vorteile der 1,3-dipolaren Cycloaddition sind, dass das Azid und das terminale Alkin ziemlich leicht einzubauen und sehr stabil unter Standardbedingungen sind [76, 82]. Beide sind nicht anfällig gegen Sauerstoff, Wasser, alltägliche organische Lösungsmittel, biologische Moleküle, pH's, Hydrolyse und reduzierende Umgebung usw. [76, 77, 83]. Wegen aller dieser Punkte wird die 1,3-dipolare Cycloaddition im großen Umfang verwendet.

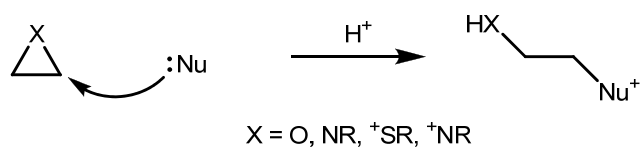
Biokompatible Blockcopolymere spielen eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen Anwendungen [74]. Typisch sind die zwei folgenden Methoden, die zur Synthese von Blockcopolymeren angewendet wurden: (1) die lebende/kontrollierte freie radikalische Polymerisation über sequentielle Addition von unterschiedlichen Monomeren, wie z.B. ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization), RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization), ROP (Ring-Opening Polymerization) oder ihre Kombination [84, 85]; (2) Polymerisation durch Verbindung unterschiedlicher linearen Polymerketten über ihre funktionale Endgruppen. Die letztere Methode wird wegen des Mangels an effiziente Linker-Chemie selten verwendet. Allerdings wurde diese Beschränkung über Entwicklung der Click-Chemie aufgehoben. Die Click-Chemie ist eine der effizientesten Methoden, mit der zwei beliebige Homopolymere zu Blockcopolymer umwandbar sind. Für die Linker-Chemie in der pharmazeutischen Forschung ist sie daher sehr geeignet.

Cycloaddition

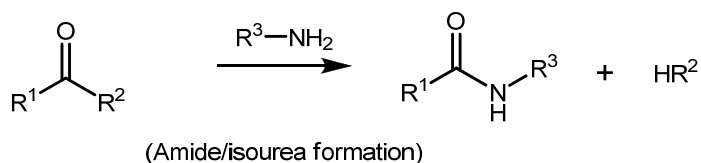
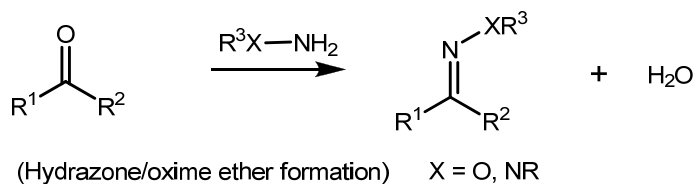


(Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of azides and terminal alkynes)

Nucleophilic Ring-Openings



Non-Aldol Carbonyl Chemistry



Carbon Multiple Bond Additions

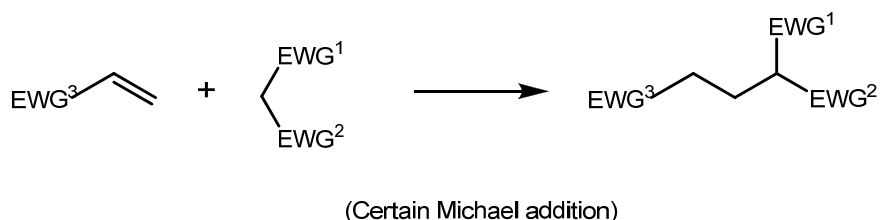
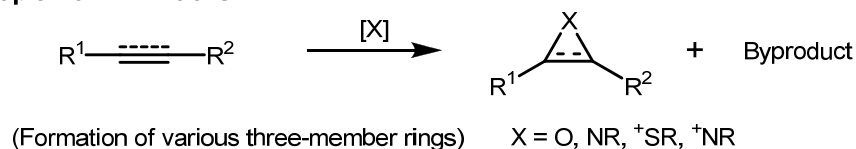


Abb. 6 Klassifizierung der Click-Reaktionen zusammen mit entsprechenden Beispielen [74]. (Nu, Nucleophile; EWG, electron withdrawing group.)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ‚völlig‘ bioabbaubare disulfidhaltige PEG-PEI-Copolymere als nicht-virale Genvektoren zur Verabreichung von Plasmiden herzustellen. Wie oben erwähnt haben die aus hochmolekularem PEG und hochmolekularem PEI bestehende AB- oder ABA-Block-Copolymere effiziente DNA-Kondensationsfähigkeit und verbesserten pharmazeutischen Charakter gezeigt [71, 72], weshalb hier das hydrophile nichtionische PEG als zweiter Block mit PEI copolymerisiert wurde. Allerdings wird die *in-vivo*-Anwendung der PEG-PEI-Copolymere wegen ihrer Nicht-Abbaubarkeit beschränkt. Als bioabbaubare Bindungen gewannen die Disulfid-Brücken höheres Interesse als Ester- oder Amid-Bindungen, weil sie in reduzierender Umgebung (z.B. in Endosomen/Lysosomen) spaltbar sind. Es wurde zwar über Disulfid-verknüpfte PEG-PEI-Copolymere [51, 65, 66] berichtet, diese sind jedoch nicht ‚völlig‘ abbaubar. Disulfid-verknüpfte PEG (PEG-SS-PEG) [86] und PEI (PEI-SS-PEI) [87, 88] wurden synthetisiert. Dies brachte die Idee mit sich, dass kurze PEG- und PEI-Blöcken miteinander über Disulfid-Brücken zu verknüpfen und zu einem hochmolekularen Polymer anwachsen zu lassen. Dadurch wird erwartet, ein ‚völlig‘ abbaubares PEG-SS-PEI zu erhalten, über das bisher selten berichtet wurde. Da die Transfektionseffizienz und die Cytotoxizität von PEI mit dem Molekulargewicht zunehmen, sollten die dargestellten bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymere sowohl hohe Transfektionseffizienz als auch niedrige Toxizität erzielen. Diese aus niedermolekulare Bausteinen (< 2000 Da) bestehenden hochmolekularen Copolymere (~ 25 kDa) sollten die gewünschten Ziele erfüllen.

Die vorliegende Arbeit ist inhaltlich in folgenden vier Teilen gegliedert. Die ersten drei Teile beziehen sich auf die Synthese der Disulfid-verknüpften, bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymere und der letzte auf die Beurteilung der dargestellten Copolymere als nicht-virale Vektoren für die *in-vivo*-Anwendungen. Im ersten Teil wird ein bifunktionaler Linker (SMPT) verwendet, welches gegen Thiole und Amine empfindlich ist. Lineare PEI 2500 Da, verzweigtes PEI 2000 Da und PEG 1000 Da

werden als kleine Bausteine der zu synthetisierenden Copolymere gewählt. Die Hydroxylgruppen des PEGs werden zuerst mit Thiol-Gruppen substituiert. Nach Kupplung des SMPT an PEI wird das mit Thiol modifizierte PEG mit PEI durch Bildung der neuen Disulfid-Bindungen copolymerisiert. Im zweiten Teil wird ein kommerzieller Linker (SAT(PEO)₄) verwendet. Einige strukturähnliche, bifunktionale, von Tetraethylenglykol (TEG) ausgehende Linker wurden ebenso dargestellt. Die funktionale Gruppe des PEG-Linkers sind Thiolacetat und eine Carbonsäure bzw. ein Aldehyd. Die Blockcopolymerisation von PEG und PEI (2000 Da) wird versucht durch Bildung der Disulfid-Brücken oder Amidierung bzw. Reduktion des Imins zu realisieren. Im dritten Teil werden das verzweigte PEI 2000 Da mit dem Alkin und TEG mit dem Azid modifiziert. Durch Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition, die sogenannte Click-Chemie, werden PEG und PEI copolymerisiert. PEI-SS-PEI werden ebenso über Click-Chemie synthetisiert. Abschließend werden die physikalischen und pharmazeutischen Eigenschaften einiger der dargestellten Polymere untersucht. Untersucht werden die Bioabbaubarkeit, die Komplexierungsfähigkeit mit DNA, die Größe und das Zetapotenzial der Polyplexe sowie ihre mittels AFM dargestellte Morphologie, die Cytotoxizität und die Transfektionseffizienz in L929-Zellen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Verwendet wurden Polymere wie verzweigtes Polyethylenimin von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (Mw 25000, 5000, 2000, 800), lineares Polyethylenimin von Polysciences (Eppelheim, Deutschland) mit dem Molekulargewicht von 2500, und Polyethylenglykol (Mw 1000) von Fluka (Buchs, Deutschland). Das pCMV-luc Plasmid von Plasmid Factory (Bielefeld, Deutschland) wurde bei den Untersuchungen von Transfektion und Cytotoxizität angewendet, sowie die Plasmid DNA (pklac1: 9091bp) von NEB (New England Biolabs, UK) für Aufnahme der AFM-Abbildung, und Herring Testes DNA von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) für Größe- und Zetapotenzialmessungen der Polyplexe über PCS (Photonencorrelationsspektroskopie) und auch bei der Gel Retardation Assay. L929 Zellen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden in DMEM Low Glucose (PAA, Cölbe, Deutschland) mit Glutamin (150 mM) in Gegenwart von 10 % fetalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS, Cytogen, Sinn, Deutschland) gezüchtet und bei 37 °C unter CO₂-Atmosphäre (8.5 %) inkubiert. Alle anderen Chemikalien und Lösungsmitteln wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

2.2 Charakterisierungsmethoden

2.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR-Spektren und ¹³C-NMR-Spektren der Linker und Polymere wurden entweder mit einem Eclipse+ Spektrometer von JEOL (Tokyo, Japan) bei 400 MHz und 500 MHz oder an dem Gerät ARX-300 (¹H: 300 MHz; ¹³C: 75 MHz) der Firma Bruker bei Raumtemperatur gemessen. Die Spektren wurden über die Software von Delta (Version 4.3.6) und MestReC 2.3 analysiert. Die chemischen Verschiebungen (δ)

sind in ppm angegeben. Die Multiplizität wurde als s (Singlet), d (Duplett), t (Triplet), q (Quartett), qi (Quintett) und m (Multipllett) bezeichnet.

2.2.2 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Molekulargewichte der in der vorliegenden Arbeit hergestellten Polymeren wurden mittels Gel-Permeations-Chromatographie entweder nach absoluter oder relativer Methode bestimmt.

Der apparative Aufbau der absoluten GPC besteht aus einer HPLC-Pumpe L-6000 von Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland) und einem Laserlichtstreuophotometer (MALLS-Detektor, Wyatt Technology, Typ Dawn DSP Laser Photometer, Dernbach, Deutschland). Die Trennung erfolgte über eine Kombination einer Vorsäule Novema präparativ und den beiden Chromatographiesäulen Novema präparativ linear und Novema 30 von Polymer Standard Service (PSS, Mainz, Deutschland) 1 %-ige Ameisensäure wurde als Laufmittel bei 35 °C mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Das Laufmittel wurde aus Reinstwasser hergestellt und vor der Nutzung filtriert (0.2 µm, Anotop 10, Whatman) und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Molekulargewichte wurden mit Software Astra V. 5.1.9.1 für Windows berechnet.

Der apparative Aufbau der relativen GPC besteht aus einer HPLC-Pumpe L-6000 von Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland) und einem Differential-Refraktometer (RI-Detektor, Perkin Elmer). Die Trennung erfolgte über eine Kombination von einer Suprema-Vorsäule, SupremaMax 100 und SupremaMax 3000 Säule von Polymer Standard Service (PSS, Mainz, Deutschland) 1%-ige Ameisensäure wurde als Laufmittel bei 37 °C mit Flussrate von 0.5 mL/min verwendet. Das Laufmittel wurde aus Reinstwasser hergestellt und vor der Nutzung filtriert (0.2 µm, Anotop 10, Whatman) abfiltriert und im Ultraschallbad 30 Minuten entgast. Als Standards wurde verzweigtes Polyethylenimin von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (Mw 25000, 5000, 2000, 800) zur

Kalibrierung angewendet. Die Eichung mit den Standards ergibt bei Auftragen des Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Elutionszeit eine Gerade.

Falls nicht anders angegeben wurde die Molekulargewichte in der vorliegenden Arbeit über die relative Methode ermittelt.

2.2.3 Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an einem FT-IR-Spektrometer ALPHA Platinum ATR der Firma Bruker aufgenommen. Die Lage der Absorptionsbanden ist in (cm^{-1}) angegeben; die Intensitäten mit br (breit), s (stark), m (mittel) und w (schwach).

2.2.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem *Finnigan TSQ 700* (ESI) in der analytischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg.

2.2.5 UV-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden an einem UV/Vis-Spektrometer *UV-160* von *Shimadzu* (Duisburg, Deutschland) aufgenommen. Die Datenauswertung wurde mit Hilfe der Software *Origin®* Version 7.0 von *OriginLab* (Northampton, MA, USA) durchgeführt.

2.2.6 Quantifizierung des Polymers über Cu-Assay [89, 90]

Der Kupfer-Komplexbildungs-Assay wurde in einer CuSO_4 -Lösung (950 μL , 1.45 mg/mL), die 0.1 N Kaliumacetat enthält, durchgeführt. Dazu wurden fünfmal jeweils 5 μL der zu analysierenden Polymerlösung vermessen. Die Lösung wurde dann mit einem UV/VIS-Spektrometer *UV-160* von *Shimadzu* (Duisburg, Deutschland) bei 285 nm untersucht. Diese Messung wurde dreifach wiederholt. Als Referenz wurde die

Extinktion einer Kalibrationsreihe von PEI 25 kDa mit definierter Konzentration ermittelt. Im Bezug auf die Standard-PEI-Lösung konnte die Konzentration des Polyethylenimins, welche den Anteil von Polyethylenimin in der Polymerlösung bedeutet, bestimmt werden. Diese aus den Kupfer-Assay erhaltene PEI-Konzentration ist eine wichtige Größe zur Berechnung der N/P-Verhältnisse.

2.2.7 Bestimmung des Thiol-Gehalts mittels Ellman's Reagenz [91]

Ellman's Methode wurde in der Vorliegenden Arbeit zur Kinetikuntersuchung der Polymerisationsreaktion verwendet, da die Polymerisation durch Bildung der Disulfid-Brücke über freies Thiol in der Lösung erfolgt. Zu 2 mL des PBS-Puffers wurden 250 μ L von Ellman's Reagenz (2,2-Dinitro-5,5-dithiodibenzoesäure, DTNB, 2.0 mmol/L) und 250 μ L der Reaktionslösung bei definierter Reaktionszeit hinzu pipettiert und vermischt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten wurde die Lösung mit einem UV/VIS-Spektrometer *UV-160* von *Shimadzu* (Duisburg, Deutschland) bei 412 nm untersucht. Die Datenauswertung wurde mit Hilfe der Software *Origin®* Version 7.0 von *OriginLab* (Northampton, MA, USA) durchgeführt.

2.3 Abbauuntersuchung mit DTT

2.3.1 PEI-SS-PEI

In PBS Puffer (950 μ L, pH 7.4) wurde 1.9 mg PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2) gelöst. Nach einer Inkubation bei 37 °C wurde Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Danach wurde jeweils 100 μ L der Reaktionslösung bei 0 h, 5 h und 24 h herausgenommen und mit destilliertem Wasser (100 μ L) verdünnt. Nach Abfiltrieren mit Spitzenfilter (0.02 μ m, Anotop 10, Whatman) wurden die Lösungen mittels relativer GPC über SupremaMax-Säulen detektiert. Die Größe der Abbauprodukte wurde mit Hilfe der aus PEI-Standards erstellten Kalibrationskurve ermittelt.

2.3.2 PEI-PEG-SS-PEG-PEI

Die Abbauntersuchung von PEI-PEG-SS-PEG-PEI wurde in 5 % Glucose (pH 7.4) in Gegenwart von DTT (100 mM) bei RT durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde jeweils bei 0 h, 2 h und 24 h herausgenommen und über relative GPC (SupremaMax) detektiert. Die Größe der Abbauprodukte wurde mit Hilfe der aus PEI-Standards erstellten Kalibrationskurve ermittelt.

2.4 Komplexierung mit DNA

Die aus Plasmid DNA und Polymeren angefertigten Polyplexe wurden entsprechend der Literatur [92] in steriler isotonischer 5 %iger Glucose-Lösung bei pH 7.4 hergestellt. DNA wurde mit einer bestimmten Menge an Polymer-Lösung durch heftigen Pipettieren vermischt. Die Mischung wurde dann Vorversuchsbeginn 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration der pDNA (pklac1: 9091bp) in der fertigen Polyplex-Lösung beträgt 1.5 µg/mL bei einem N/P-Verhältnis von 7 für AFM-Untersuchung. Für andere Untersuchungen beträgt die Konzentration der pDNA (pCMV-luc) jeweils 20 µg/mL für *in-vitro*-Untersuchungen und 260 µg/mL für *in-vivo*-Untersuchungen in der fertigen Polymer-Lösung. Die Messungen wurde bei unterschiedlicher N/P-Verhältnisse im Bereich von 0.5 -80, welche durch Zugabe von Polymeren mit bestimmten Mengen erzielt wurde, durchgeführt. Zur Bestimmung der N/P-Verhältnisse von PEG-PEI-Copolymer/DNA-Polyplexe wurde die Konzentration des Polymers nach dem PEI-Anteil von PEG-PEI-Copolymer verwendet. Dieser Wert wurde über Kupfer-Assay [93] ermittelt und beträgt 34.5 %.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Polymeren von PEG-PEI-SS-PEI-PEG und PEI-SS-PEI sowie reinem PEI (2 kDa, 25 kDa) zur Komplexierung mit entweder HT-DNA oder Plasmid DNA zur Bildung der Polyplexe angewendet.

2.5 Größe und Zetapotenzial [94]

Der hydrodynamische Radius sowie das Zetapotenzial von frisch hergestellten Polyplexen aus Herring Testes DNA (HT-DNA) und Polymeren (PEI 2 kDa, PEI 25 kDa oder PEG-PEI-Copolymer) wurden bei 25 °C mit Hilfe des Zetasizer Nano-ZS von Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland), welches mit einer 4 mW He-Ne Laser bei einer Wellenlänge von 633 nm eingerichtet ist, vermessen. Das Streulicht wurde bei einem rückständigen Winkel von 173° mit automatischer Messposition und automatischer Laser Attenuation detektiert. Die Viskosität und der Brechungsindex von reinem Wasser bei 25 °C wurden zum Analysieren von Daten angewendet. Die hydrodynamische Größe wurde in Mikro-Zelle mit einer Probelösung von 50 µL vermessen, während das Zetapotenzial in folded capillary cells nach einer Verdünnung von 7:15 mit 5 % Glucose vermessen wurde. Die Ergebnisse wurden mittels DTS Software v4.10 ausgewertet. Die Messwerte werden als Durchschnitt von mindestens fünf Messungen von jeweils 10 Verläufen angegeben. Vermessungen der Polyplex-Lösungen bei allen N/P-Verhältnisse wurden zweimal mit jeweils neu hergestellten Proben durchgeführt.

2.6 Gelelektrophorese

Agarose-Gel-Elektrophorese wurde entsprechend der Literatur [49] durchgeführt. Die aus PEG-PEI-Copolymer und HT-DNA hergestellten Polyplex-Lösungen mit zunehmender Menge von Polymer, nämlich mit zunehmenden N/P-Verhältnisse, wurden 30 Minuten inkubiert. Es wurde dann jeweils 25 µL der Polyplex-Lösungen auf ein 1 %iges Agarosegel, welches vorher mit 60 µg Ethidiumbromid (EtBr) versetzt wurde, geladen. Die Gele wurden eine Stunde bei 70 mV in TBE-Puffer entwickelt. Zur Visualisierung stand ein Biometra Gel-Analyse System (BioDoc Analyzer, Biometra, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung. Die aus reinem PEI (2 kDa, 25 kDa) und HT-DNA hergestellten Polyplex-Lösungen wurden als Kontrolle verwendet.

2.7 Morphologie der Polyplexe (AFM) [92]

Die Morphologie der PEG-PEI-Copolymer/DNA-Polyplexe wurde mittels der Rasterkraftmikroskopie (JPK NanoWizard® AFM System, Deutschland) im Tapping-Mode unter Luft vermessen. Alle Abbildungen wurden bei einer Abtastungsgeschwindigkeit von etwa 0.7 Hz mit einer Auflösung von 512×512 Pixel ausgeführt. Silicon nitride oxide-sharpened cantilevers wurden verwendet und bei Resonanzfrequenzen von ca. 10 kHz betrieben. 40 μ L der Polyplex-Lösung wurde auf einem platziert. 10 mM Nickelchlorid wurde zur Fixierung des Plasmids auf der Glasoberfläche hinzugefügt. Die frisch hergestellten Polyplexe wurden abgetastet. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße von den Abbildungen wurden die Durchmesser auf halber Höhe aus mindestens 30 Polyplexe analysiert.

2.8 Messungen der Cytotoxizität über MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde in L929 Mausfibroblasten entsprechend der in der Literatur [95, 96] angegebenen Methode durchgeführt. L929 Fibroblasten wurden mit einer Dichte von 8000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden serielle Lösungen von reinem PEI (2 kDa, 25 kDa) und dem über Click-Chemie hergestellten PEG-PEI-SS-PEI-PEG-Copolymer (0.15-5000 μ g/mL in Zellen-Medium) zugegeben und weitere vier Stunden inkubiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgesaugt und durch 200 μ L frisches Medium mit 0.2 mg/mL (3-(4,5-dimethylthiatol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)/Well (MTT, Sigma, Seelze) ersetzt. Nach Inkubation von vier Stunden wurde der unreaktierte Farbstoff entfernt und 200 μ L DMSO hinzugefügt. Der ELISA-Reader (*Titertek plus MS 212*, ICN, Eschwege, Deutschland) wurde zur Bestimmung der Absorbtion bei 570 nm und der Korrektur des Hintergrunds bei 690 nm angewendet. Die relative Viabilität von Zellen (%) wurde über $\text{Absorption}_{\text{test}} / \text{Absorption}_{\text{control}} \times 100 \%$ ausgerechnet, während Wells mit reinem Zellkulturmedium in Abwesenheit von Polymeren als Kontrolle verwendet wurden. Die Werte der Polymeren wurden

mit einer logarithmischen Sigmoidalfunktion über Origin® v 7.0 (OriginLab, Northampton, MS) gefittet. Versuchen wurden im Quadruplikat durchgeführt.

2.9 Transfektion

L929-Zellen wurden mit einer Dichte von 6000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausgesät. Danach wurden die Zellen in serumfreien Medium mit oder ohne Glutathionester (5 mM) eine Stunde weiter inkubiert. Das Medium wurde aspiriert und mit 75 µl frischem Medium ausgetauscht. Dann wurden 25 µl frisch hergestellte Polyplexe in die Zellen hinzugefügt. Nach vier Stunden wurde das Medium wieder durch frisches Medium (200 µl/Well) ersetzt und die Zellen wurden weitere 44 Stunden wachsen gelassen. Die Transfektionsaktivität wurde entsprechend dem von Promega (Madison, WI, USA) angebotenen Protokoll im Zelllysat vermessen. Die relativen Lichteinheiten wurden über FLUOstar Optima (BMG labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. Das Protein wurde mit Hilfe von BCA Protein Assay Kit (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ermittelt [97].

3. Ergebnis und Diskussion

3.1 Polymersynthese und Charakterisierung

3.1.1 Synthese von bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit SMPT

Ziel war es, ein bioabbaubares PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit dem Linker SMPT (4-Succinimidylloxycarbonyl- α -methyl- α -[2-pyridyldithio]toluol) herzustellen. Dafür wurde eine dreistufige Reaktion geplant. Das niedermolekulare PEG wurde zuerst an beiden Enden mit Thiol-Gruppen modifiziert. Niedermolekulares PEI wurde mit SMPT verbunden. Durch den nucleophilen Angriff der Amin-Gruppe des PEIs an der NHS-Gruppe des SMPT wurde die NHS-Gruppe abgespalten und es erfolgte somit die Kupplung von PEI und SMPT. Abschließend wurden das bifunktionale PEG und das mit SMPT verbundene PEI zusammengesetzt. Die Copolymerisation erfolgte durch die Bildung der Disulfid-Brücke nach Abspaltung von Pyridin-2-thiol.

3.1.1.1 Synthese von HS-PEG-SH

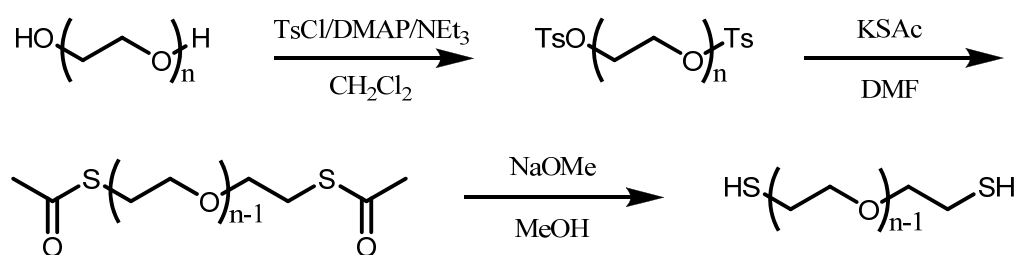


Abb. 6 Synthese von Thiol-modifiziertem bifunktionalem PEG1000.

Die Synthese von Thiol-modifiziertem bifunktionalem PEG erfolgte in drei Stufen (siehe Abb. 6) [86]. Die Hydroxyl-Gruppen von PEG wurden zuerst mit einer guten

Abgangsgruppe, der Tosylgruppe, modifiziert. Bei 60 °C wurde die Tosylgruppe mit einer Thiolacetat-Gruppe, eine geschützte Form der Thiol-Gruppe ersetzt. In der dritten Stufe wurde die Thiolgruppe entschützt, und es resultierte ein mit einer Thiol-Gruppe modifiziertes PEG-Derivat.

Die Modifizierung von PEG mit einer Tosylgruppe erfolgte innerhalb von 24 h. Die Aufreinigung des öligen Produkts mit der Struktur TsO-PEG-OTs war sowohl durch eine chromatographische Methode als auch durch Ausfällen möglich. Zum Vergleich der beiden Reinigungsmethoden lieferte die chromatographische Methode saubere Produkte aber mit höherem Verlust. Durch Ausfällen erhielt man das Rohprodukt in einer höheren Ausbeute von ca. 84 %. Die Charakterisierung der Struktur erfolgte mit Hilfe von NMR-Spektren (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC).

Die Entschützung der Thiol-Gruppe erfolgte durch Reduktion mit Natriummethoxid in trockenem Methanol. Nach der Synthese wurde der pH-Wert der Reaktionsmischung mit Essigsäure auf pH 5 ~ 6 eingestellt. Als Verunreinigung konnten Methanol und Essigsäure unter Vakuum abgezogen werden. Da die einzige übrige Verunreinigung, das Natriumacetat, schlechte Löslichkeit in organischem Lösungsmittel besitzt, wurde das Rohprodukt in Methanol gelöst und durch Abfiltrieren gereinigt. So wurde das thiol-modifizierte PEG produziert und mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie (400 MHz, CD_3OD) charakterisiert.

Da die Thiol-Gruppe in Kontakt mit Sauerstoff, besonderes in Lösung, leicht zur Disulfid-Verbindung oxidiert werden kann, wurden zwei Substanzen im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet (siehe Abb. 7). Eine davon ist das thiol-modifizierte PEG, die Andere ist ihre Oxidationsform, das mit Disulfid verbundene PEG. Die beiden Substanzen unterscheiden sich in der mit Schwefel-Atom verbundenen CH_2 -Gruppe. Das Triplett mit der chemischen Verschiebung von 2.72 ppm zu der mit der Thiol-Gruppe verbundenen CH_2 -Gruppe, während das mit $\delta = 2.50$ ppm zu der

mit der Disulfid-Brücke verbundenen CH₂-Gruppe gehört. Vermisst man diese NMR-Probe nach einiger Zeit, verkleinert sich das Signal bei $\delta = 2.50$ ppm, während der Peak bei $\delta = 2.72$ ppm sich vergrößert. Dieses Ergebnis liefert den Beweis für die Zuordnung der beiden Substanzen im ¹H-NMR-Spektrum.

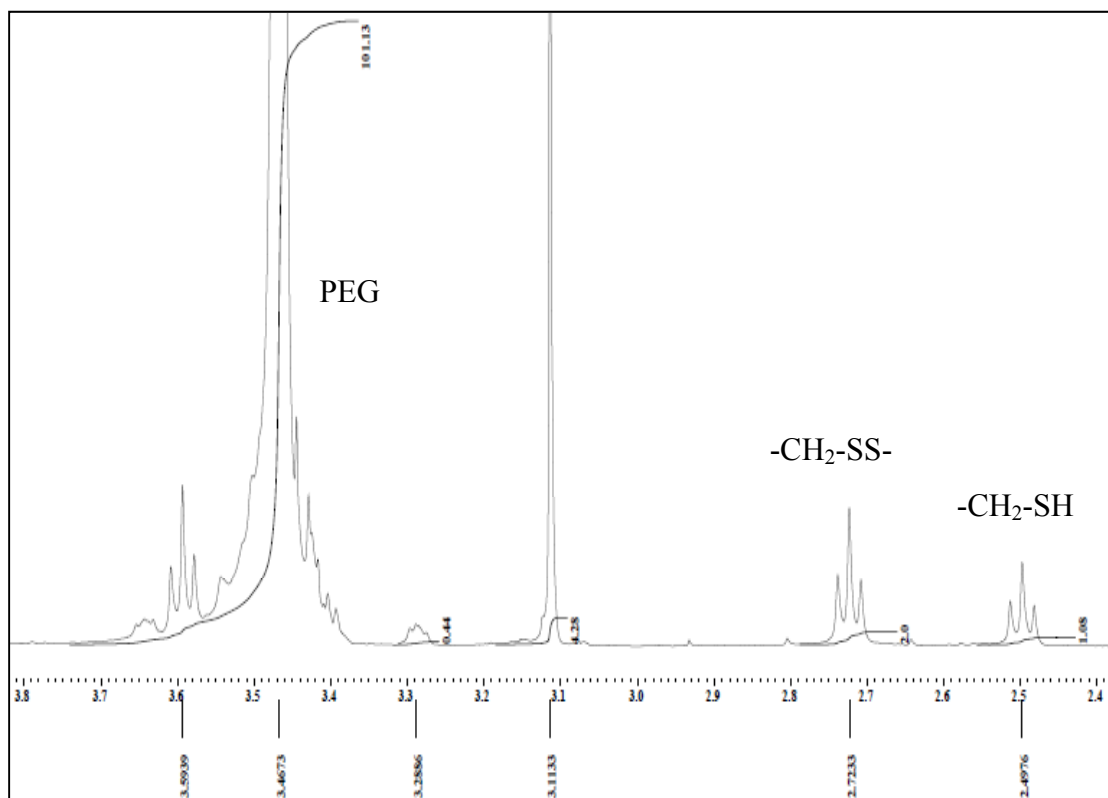


Abb. 7 ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD) von HS-PEG-SH.

3.1.1.2 Modifizierung von linearem Polyethylenimin mit SMPT

SMPT ist reaktiv gegen Thiol und Amin. Es wird häufig für Konjugation zwischen einem Toxin-Molekül und einem monoklonalen Antikörper angewendet. Beispielsweise hat das aus SMPT hergestellte Immunotoxin im Vergleich zu dem aus SPDP einen Benzol-Ring und eine Methyl-Gruppe neben dem mit Pyridin-2-thion verbundenem Kohlenstoff. Die daraus verursachte sterische Hinderung der Disulfid-Bindung erhöht die Konjugationsstabilität *in vivo*. Daher ist SMPT stabiler gegen Hydrolyse in wässrige Lösung als andere mit NHS zu verknüpfende Linker [98]. Das SMPT hat eine ähnliche Struktur wie SPDP mit gleichen funktionalen

Gruppen. Da das SPDP PEI und PEG effektiv koppeln kann, wurde SMPT zur Kupplung für PEI und PEG gewählt. In dieser Arbeit wurde SMPT statt SPDP verwandelt, da der Benzol-Ring von SMPT im NMR-Spektrum leicht erkennbar ist. Im Vergleich zu SPDP, besteht die Möglichkeit, das Verhältnis zwischen gekoppeltem Linker und PEI mittels ^1H -NMR-Spektroskopie zu berechnen, während mit SPDP diese Berechnung schwer zu realisieren ist. Da die CH_2 -Gruppen von SPDP ähnliche chemische Verschiebungen wie die von PEI haben, beeinflussten die dadurch verursachte Überlappung der Integrale von PEI und Linker die Analyse.

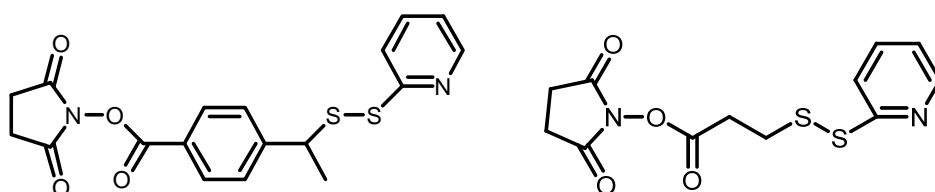


Abb. 8 Strukturformel des SMPT (links) und des SPDP (rechts).

Das kommerzielle lineare PEI 2500 (Polysciences, Germany) enthält außer sekundären Aminen noch acylierte tertiäre Amine. Es wurde aus dem ^1H -NMR-Spektrum von linearem PEI 2500 berechnet, dass das Verhältnis zwischen acyliertem Amin und deacyliertem Amin ca. 1:17 beträgt. Von ca. 54 Baueinheiten einer PEI-Kette, sind ungefähr 3 acylierte Amine vorhanden. Das acylierte Amin kann nicht mit Linker reagieren, aber es besetzt nur ca. 5-6 % aller Amine in der Polymerkette. So sollte es nicht stark auf die Kupplung mit dem Linker auswirken. Daher wurde das kommerzielle lineare PEI 2500 ohne vorherige Deacylierung direkt eingesetzt.

Lineares PEI 2500

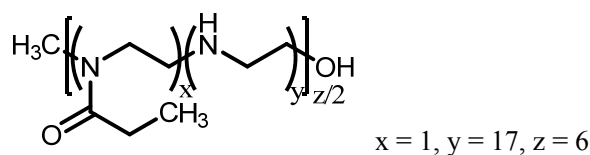


Abb. 9 Die aus ^1H -NMR-Spektrum berechnete Modell-Strukturform von linearem PEI 2500.

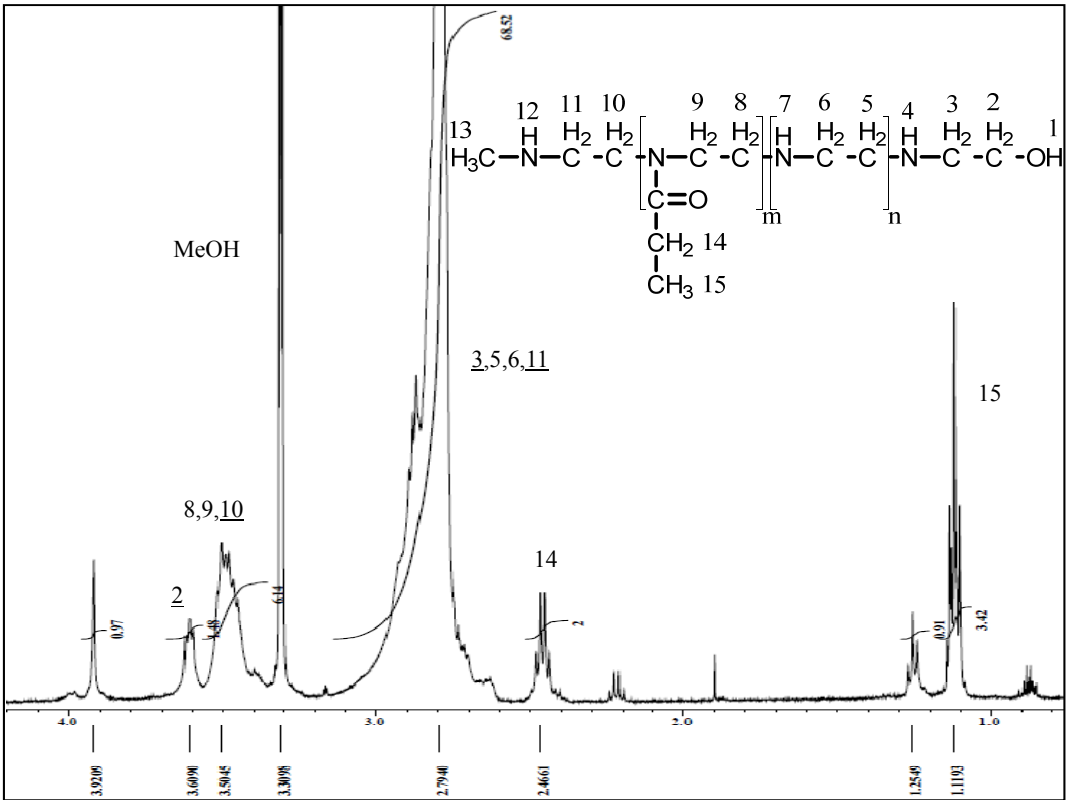


Abb. 10 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_3OD) von linearem PEI 2500 (2, 3, 10, 11: Zuordnung durch Einschätzung).

Hierbei wurde das lineare PEI 2500 Da statt dem verzweigten PEI 2000 Da angewendet, damit die Struktur des Produkts möglich einfach dargestellt werden kann. Das lineare PEI 2500 zeigte unterschiedliche physikalische Eigenschaften als verzweigtes PEI (z.B. Löslichkeit). Das lineare PEI 2500 ist bei RT ein Feststoff, während das verzweigte PEI normalerweise als Flüssigkeit existiert. Das lineare PEI 2500 löst sich nicht in kaltem, sondern in warmem Wasser oder in kaltem Wasser bei niedrigen pH-Werten. PEI 2500 kann sich auch in einigen organischen Lösungsmitteln, wie Methanol, Ethanol und Chlorform lösen. Aber es löst sich nicht in Benzol, Diethylether oder Aceton. Im Gegensatz dazu hat verzweigtes PEI sehr gute Löslichkeit sowohl in kaltem Wasser als auch in vielen organischen Lösungsmitteln. Diese erwähnten Beschränkungen des linearen PEIs erforderten eine gute Auswahl des Lösungsmittels beim Reaktionsverlauf. Daher wurde die Modifizierung von linearem PEI 2500 mit SMPT mit unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Optimierung der Reaktionsbedingungen bei Modifizierung von linearem PEI 2500 mit SMPT.

Versuch-Nr.	1	2	3	4	5	6
Lösung	MeCN/PBS	MeCN/PBS	MeCN/PBS	Ethan./PBS	DMSO/PBS	Ethanol
V _{org.} /V _{insg.}	10 %	33 %	5 %	20 %	17 %	100 %
Temp.	RT	RT	45 °C	RT	RT	RT
Rk. Zeit	2 h	24 h	2 h	2 h	> 24 h	24 h

Die Reaktionsbedingungen wurden stark von der Struktur und den Eigenschaften von linearem PEI 2500 beeinflusst. Die Kupplung von linearem PEI 2500 und SMPT wurde zuerst nach der Standardprotokoll [98] durchgeführt. Da das SMPT unlöslich in Wasser ist, wurde es in Acetonitril gelöst und dann bei RT zu PEI-Lösung in PBS-Puffer (pH 7.2~7.4) zugegeben. Wegen schlechter Löslichkeit von linearem PEI 2500 in kaltem Wasser wurde es im PBS-Puffer suspendiert. Durch Erwärmen oder starkes Verdünnen konnte das lineare PEI besser gelöst werden. Nach Zugabe von SMPT bei RT fiel sofort ein weißer Feststoff aus. Der Niederschlag wurde nach Zentrifugation isoliert und getrocknet, und dann mittels ¹H-NMR-Analyse in CDCl₃ charakterisiert. Das Spektrum zeigte dieselben Signale wie SMPT. Es wurde daraus geschlossen, dass die Reaktion uneffizient war, während der Linker aus der Lösung ausgefallen ist. Es wurde bei der Reaktion ungefähr vier Äquivalente Linker im Vergleich zu PEI eingesetzt. Aus dem ¹H-NMR-Spektrum ging hervor, dass nur ca. ein Äquivalent SMPT an PEI gekoppelt wurde. Um die Kupplungseffizienz zu erhöhen, wurde versucht, die Reaktionsbedingungen durch Veränderung des Mischungsverhältnisses von Lösungsmitteln, der Temperatur sowie der Reaktionszeit zu optimieren.

Da SMPT sich nicht im Wasser löst, fiel es bei kleinem Volumenanteil an organischem Lösungsmittel (z.B. mit 10 % MeCN in PBS-Lösung) sofort aus der Reaktionslösung aus, was die Reaktionseffizienz verschlechterte. Nahm der Bestandteil von Acetonitril auf 33 % zu, blieb SMPT in Lösung. Nach der Zugabe

von Ethanol oder DMSO, zeigte die gemischte PBS-Lösung bessere Löslichkeit und Kompatibilität für Linker im Vergleich zu MeCN-PBS-Mischung. Bei einem Volumenanteil von 17 % DMSO oder 20 % Ethanol in PBS war der Linker besser löslich.

Es wurde versucht die Reaktion bei 45 °C durchzuführen, um die bessere Löslichkeit von linearem PEI 2500 in PBS zu erhalten. In Anwesenheit von 5 % Acetonitril wurde kein Ausfall von SMPT aus der Lösung beobachtet. Die Reaktionsmischung blieb während dem Reaktionsverlauf klar. Allerdings wurde die Kupplungseffizienz von SMPT an PEI nicht erhöht. Vermutlich wurde SMPT bei erwärmtem Wasser schneller hydrolysiert, so dass die Reaktivität des Linkers vor der Kupplung schon verloren war. Bei einer Verlängerung der Reaktionszeit von 2 h auf 24 h, wurde keine signifikante Zunahme der Kupplungseffizienz beobachtet. Diese Reaktionen wurden trotzdem 24 h geführt, um unvollständige Reaktion zu vermeiden.

Es wurde auch lineares PEI 2500 und SMPT jeweils in Ethanol gelöst und dann zusammengefügt. Die Reaktion konnte mit hoher Konzentration von PEI (9.6 mg/mL) bei RT laufen. Es wurde keinen Niederschlag während der Reaktion beobachtet.

Vergleicht man alle Reaktionsbedingungen miteinander, so wird deutlich, dass die Reaktion in Ethanol, in MeCN-PBS- oder DMSO-PBS-Mischung mit einem großen Anteil vom organischen Lösungsmittel besser reagiert. Die beste Reaktionseffizienz betrug gegen 1:1.

3.1.1.3 Copolymerisation von PEG-PEI mit SMPT

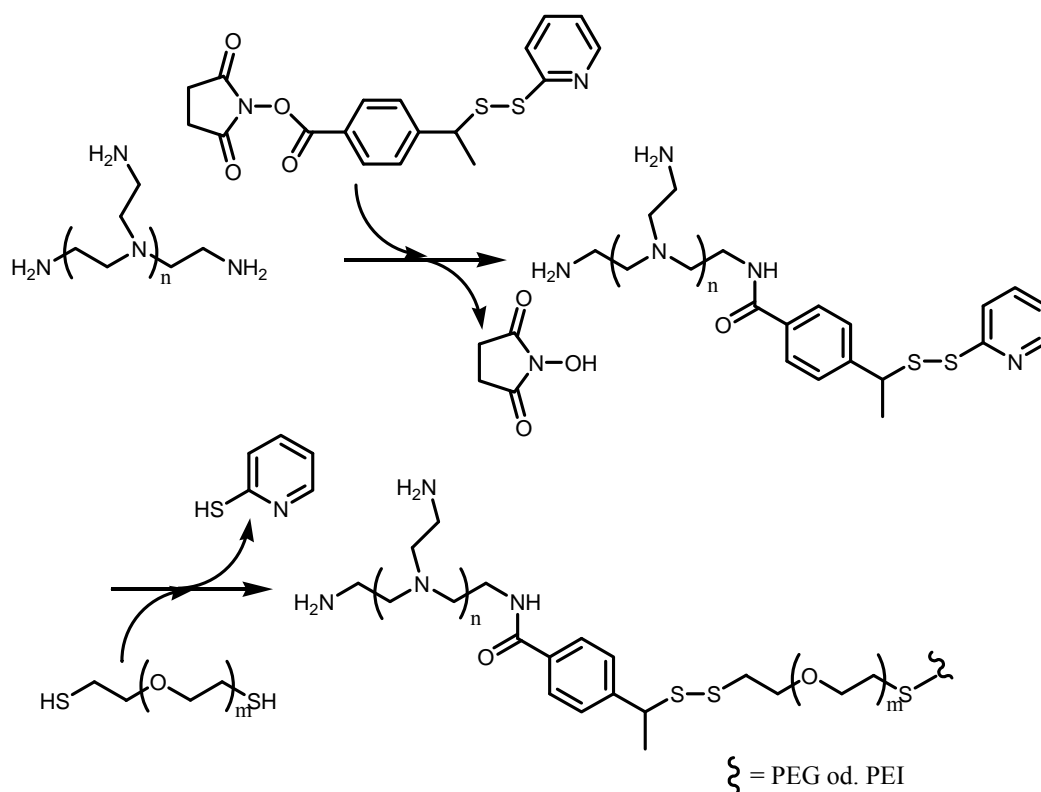


Abb. 11 Synthese des PEG-PEI-Copolymers mit SMPT.

Es wurde verzweigtes PEI 2000 statt linearem PEI 2500 für die Copolymerisation von PEG-PEI durch Kupplung von SMPT angewendet. Im Vergleich zu linearem PEI hat das verzweigte PEI den Vorteil, dass es bei RT gute Löslichkeit sowohl in wässriger als auch in organischer Lösung besitzt. Außerdem enthält verzweigtes PEI ca. 25 % primäre Amine [93], welche bessere Reaktionsaktivität als sekundäre Amine in linearem PEI besitzen. Um die Kupplungseffizienz von SMPT zu erhöhen, wurde noch 10 facher Überschuss von SMPT gegen PEI zugesetzt. Das thiol-modifizierte PEG wurde dann auch als Überschuss gegen SMPT (ca. 1:1.5) zu der Reaktionslösung eingesetzt, damit der Austausch der Disulfid-Bindungen zwischen PEG und SMPT vollständig verlaufen kann. Es wurde dann 2-Thion aus SMPT freigesetzt und somit das PEG an PEI gekoppelt. Das Produkt wurde durch Dialyse gereinigt und mittels GPC und NMR auf Größe sowie die Struktur untersucht.

GPC-Untersuchung:

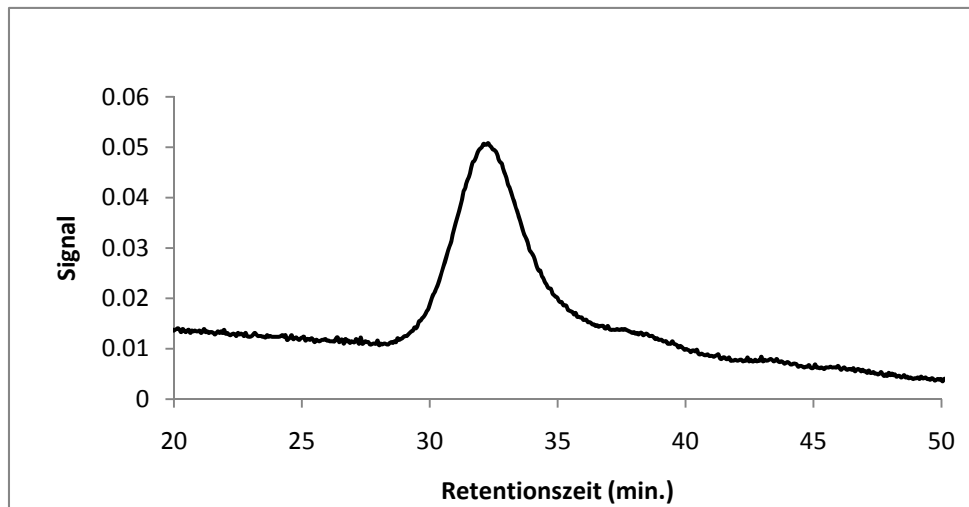


Abb. 12 GPC-Ergebnis von SMPT gekoppeltem PEG-PEI-Copolymer mit Säule von SupremaMax 3000, Flussrate von 0.5 mg/mL und Laufmittel von 1 % Ameisensäure ($M_w = 12$ kDa, PDI=2.8).

NMR-Charakterisierung:

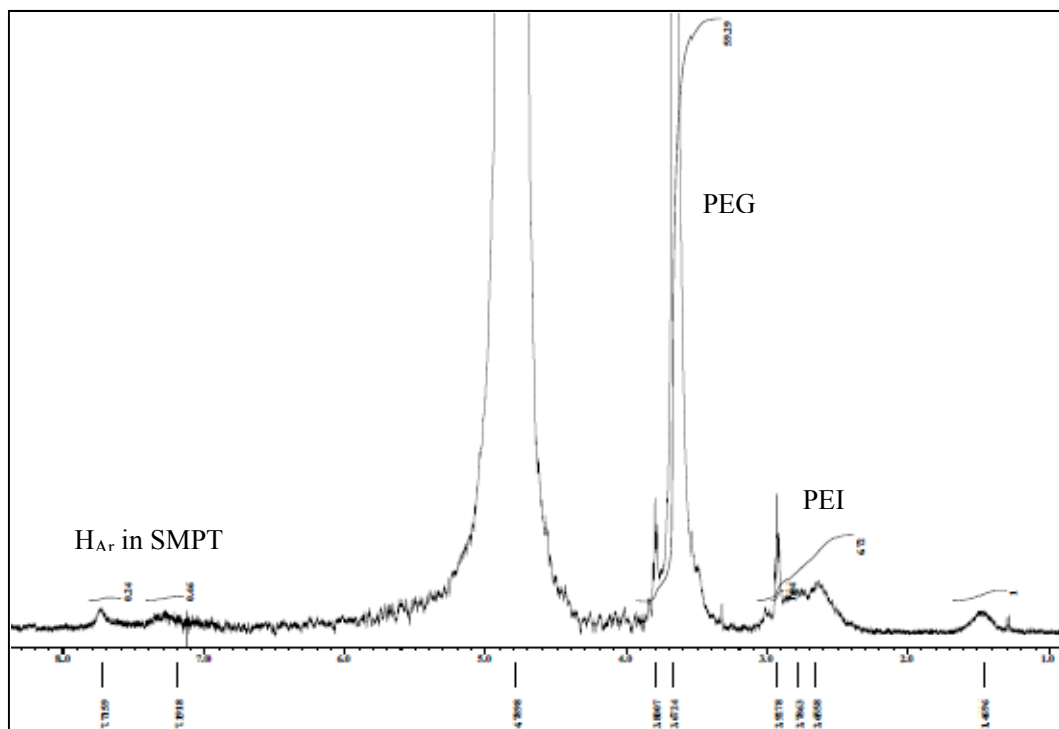


Abb. 13 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von PEG-PEI-Copolymer nach Kupplung mit SMPT.

Das GPC-Chromatogramm zeigte ein sauberes Produkt mit einem Molekulargewicht von ca. 12 kDa. Im NMR-Spektrum wurden die CH₂-Gruppen von PEG ($\delta = 2.4-3.0$ ppm) und PEI ($\delta = 3.3-3.9$ ppm) beobachtet. Die Signale zwischen 7.2 und 7.7 gehören zur aromatischen CH-Gruppe aus SMPT. Das NMR-Spektrum zeigte es, dass PEG und PEI mit Hilfe von SMPT copolymerisiert wurden. Da die Konzentration der Probe niedrig war, wurden die molaren Verhältnisse zwischen PEG und PEI (12:1) sowie zwischen PEI und SMPT (1:4.8) mittels Integralen der entsprechenden Peaks grob berechnet. In Zusammenhang mit dem Ergebnisse der GPC wurde es vermutet, dass das Copolymer aus mit PEG verkapseltem PEI bestand. Es gab keine intermolekulare Kupplung zwischen dem PEI-Ketten.

Kurzzusammenfassung:

Im Hinblick auf die Charakterisierungsmöglichkeit sowie die Stabilität gegen Hydrolyse wurde SMPT statt SPDP für die Copolymerisation von PEG und PEI verwendet. Es wurde verzweigtes PEI 2000 für Kupplung mit SMPT eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen ließen sich für verzweigte PEI im Gegensatz zu linearem wegen der besseren Löslichkeit leichter durchführen. Der Linker wurde als Überschuss von 4 auf 10 Äquivalente gegen PEI zugegeben, damit eine höhere Anzahl des an PEI gekoppelten Linkers erzielt werden konnte. Die Kupplungseffizienz im Vergleich zu der mit linearem PEI 2500 wurde zwei fach erhöht und betrug ca. 50 %. Für die Copolymerisation von PEG und PEI wurde das thiol-modifizierte PEG in einer dreistufigen Reaktion hergestellt. Die Austauschreaktion erfolgte zwischen dem mit Thiol modifiziertem PEG und dem mit PEI gekoppelten Linker. Nach der Abspaltung der 2-Thion-Gruppe wurde PEG und PEI erfolgreich miteinander gekoppelt. Das Ergebnis des NMR-Spektrums und des GPC-Chromatogramms zeigte, dass ein mit PEG gekoppelten PEI, ausgehend von verzweigten PEI 2000, mit einer Größe von ca. 12 kDa hergestellt wurde. Vermutlich wurden die PEG-Ketten miteinander durch Bildung von Disulfid vernetzt. Keine Vernetzung zwischen PEI-Ketten wurde beobachtet.

Die Copolymerisation von PEG und PEI erfolgte durch Anwendung von SMPT. Zur Herstellung einer Struktur mit mehreren Blöcken sollte das Verhältnis zwischen PEI und SMPT sowie das zwischen PEG und SMPT noch untersucht werden. Die oben erwähnte Methode liefert eine Möglichkeit zur Herstellung eines mit Disulfid gekoppelten bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymers. Dieses sollte eine niedrige Toxizität und zugleich eine hohe Transfektionseffizienz zeigen.

3.1.2 Synthese von bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit bifunktionalen PEGhaltigen Linkern

Ziel war es, ein ‚völlig‘ abbaubares, disulfid-verknüpftes PEG-PEI-Copolymer herzustellen. Bei der Verknüpfungsmethode mit SMPT wird das PEG zuerst mit freien Thiol-Gruppen modifiziert, so dass das mit SMPT verbundene PEI sich mit PEG durch Austausch der Disulfid-Bindung koppeln kann. Hierbei wurde zuerst ein PEG enthaltender kommerzieller Linker SAT(PEO)₄ angewendet. Die Kupplungsmethode zwischen PEG und PEI ist prinzipiell die gleiche wie mit SMPT. Das SAT(PEO)₄ hat einen Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, welcher häufig für Biotinylierung und Verknüpfung mit primärem Amin verwendet wird. Hierbei wurde zuerst das PEI mit SAT(PEO)₄ durch Abspaltung der NHS-Gruppe gekoppelt. Die Thiolacetat-Gruppe wurde dann mit Hydroxyamin entschützt. Die freigesetzte Thiol-Gruppe bildete dann eine Disulfid-Bindung, so dass der PEG-PEI-Block sich miteinander verknüpfen konnte. Die Anwendung von SAT(PEO)₄ hat den Vorteil, dass der Linker selbst einen PEG-Block enthält, daher wurde die Reaktionsstufe vereinfacht.

Im Vergleich zu SMPT ist SAT(PEO)₄ relativ preisgünstig, trotzdem ist es nur für Synthese mit kleinem Ansatz geeignet. Daher wurde der Linker von AcS-PEG-COOH hergestellt. Da der NHS-Ester des kommerziellen Linkers sensitiv gegen Feuchtigkeit ist, wird die funktionale Gruppe gespalten und es entsteht eine Carbonsäure-Gruppe.

Für die Kupplung mit PEI wurden HOBt und EDC als Aktivierungsreagenzien für die Carboxygruppe angewendet, welche genauso effektiv wie der NHS-Ester aber wenig Feuchtempfindlich sind.

Zum Erhöhen der Kupplungseffizienz zwischen PEG und PEI wurde noch der Linker von $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ hergestellt. Die Aldehydgruppe bildete mit einem Amin des PEIs zuerst das Imin (Schiff'sche-Base). Anschließend wurde das Imin mit NaCNBH_3 zur C-N-Einfachbindung reduziert. Da die reduzierte Form des Imins nicht reversibel ist, wurden PEI- und PEG-Block miteinander fest gebunden. Mit der gleichen Methode von $\text{AcS(PEO)}_4\text{COOH}$ wurde der gebundene PEI-PEG-Block nach der Freisetzung der Thiol-Gruppe durch Bildung von Disulfid copolymerisiert, um die gewünschte PEG-PEI-Copolymer herzustellen.

Ein disulfidhaltiger Linker von $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ wurde als eine optimierte Form von $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ hergestellt. Da die Disulfid-Bindung vorher gebunden ist, wurden die Entschützungsstufe sowie der Reinigungsschritt ausgelassen, so dass der Polymerisationsprozess zu einer Stufe vereinfacht wurde. Die Copolymerisation sollte dann durch Reduktion von aus Aldehyd und Amin gebildetem Imin kontrolliert werden.

Abschließend wurde ein tosyl-modifizierter Linker $(\text{TsO(PEO)}_4\text{S})_2$ dargestellt. Die Copolymerisation zwischen PEG und PEI durch Umsetzung der Tosylgruppen mit den Aminen des PEIs wurden ebenso untersucht.

3.1.2.1 Blockcopolymerisation von PEG-PEI durch Bildung eines Amids

3.1.2.1.1 Polymerisation mit Linker SAT(PEO)₄

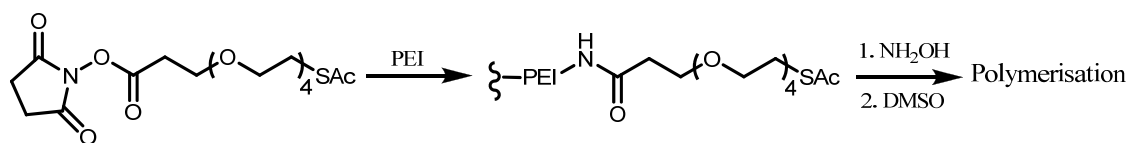


Abb. 14 Polymerisation mit Linker SAT(PEO)₄.

Die Copolymerisation zwischen PEI und dem PEGhaltigem Linker (SAT(PEO)₄) besteht aus drei Reaktionsstufen (siehe Abb. 14). Wie bereits erwähnt ist SAT(PEO)₄ ein kommerzieller Linker, welcher einen Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimid-Ester besitzt. Durch Abspaltung der NHS-Gruppe wurde das verzweigte PEI (2000 Da) mit dem Linker gekoppelt. Dieser gekoppelte PEG-PEI-Block wurde dann nach Entschützung des Thiolacetats mit Hydroxyamin durch Bildung der Disulfid-Bindung zu einer großen Kette verknüpft. Hierbei ist DMSO sowohl das Lösungsmittel als auch das Oxidationsmittel für Bildung der freien Thiol-Gruppen. Die Copolymerisation wurde als Eintopf-Reaktion durchgeführt.

Tabelle 2. Ansatz und GPC-Ergebnisse der Polymerisation mit SAT(PEO)₄.

Reaktion	PEI 2000 [mg]	SAT(PEO) ₄ [mg]	PEI/PEG [mol/mol]	pH-Wert	Mw, Konz.(%)
1	78.4	33	1:2	7.25	42 kDa, 44 %
2	78.3	33	1:2	7.24	65 kDa, 42 %
3	78.2	33	1:2	7.26	62 kDa, 44 %

Es wurde die Copolymerisation zuerst bei einem molaren Verhältnis zwischen PEG und PEI von 2 geführt, damit der kurze PEG-PEI-Block sich miteinander verknüpfen konnte. Nach Dialyse mit einer Membran von 1000 Da gegen destilliertes Wasser zeigte das GPC-Chromatogramm (siehe Abb. 15), dass ein Polymer mit Mw = 65.1 kDa hergestellt wurde. Allerdings beträgt es nur ca. 42 % (w/w) in der Polymermischung. Die Größe des niedermolekularen Produkts beträgt ca. 4 kDa, welches einem einzelnen PEG-PEI-Block entspricht.

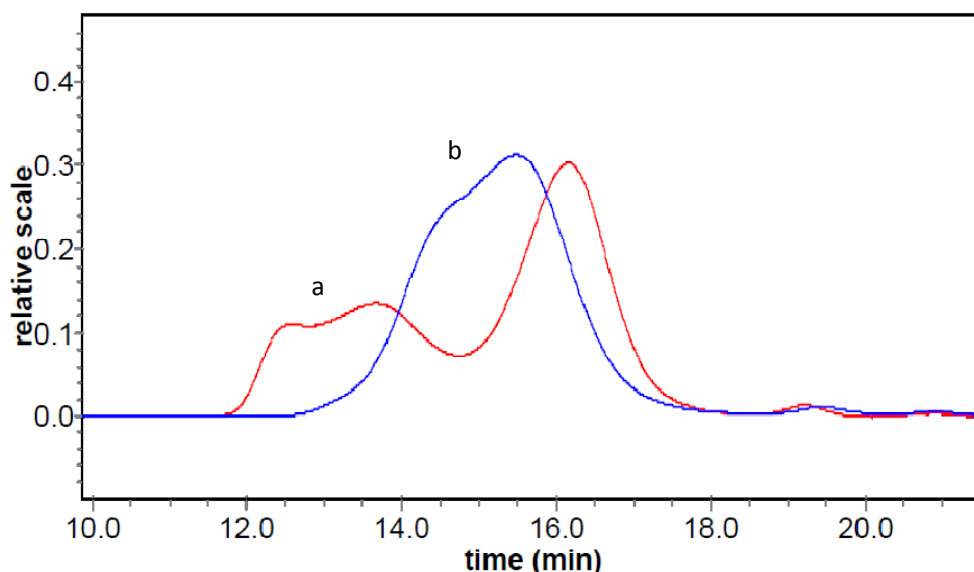


Abb. 15 GPC-Chromatogramme der Polymerisation mit SAT(PEO)₄. Produkt (11.9-14.6 min.: 65.1 kDa; 14.6-17.0 min.: 3.6 kDa) nach Dialyse mit Membran von 1 kDa (a); Produkt (8.3 kDa) nach Dialyse mit Membran von 25 kDa (b).

Aus den GPC-Ergebnissen geht hervor, dass die Polymerisation nicht vollständig war. Daher hat nur ein Teil des PEG-PEI-Block Ketten gebildet. Das NMR-Spektrum (siehe Abb. 16) zeigte ein Verhältnis von ca. 1:1 zwischen PEG und PEI. Da der NHS-Ester hydrolyselabil ist, wird die Kupplungseffizienz zwischen PEG und PEI vermutlich von diesem Faktor beeinflusst.

Nach der Dialyse mit einer Membran von 25 kDa zeigte das GPC-Chromatogramm ein unterschiedliches Ergebnis im Vergleich zu dem nach Dialyse mit 1 kDa. Während Dialyse haben sich die Größe des Copolymers sowie die entsprechenden Komponenten geändert. Das große Polymer mit einer Masse von 65.1 kDa ist verschwunden. Vermutlich hat eine Austauschreaktion der Disulfid-Bindung zwischen den großen Polymeren und der kleinen PEG-PEI-Block (4 kDa) stattgefunden. Dann bildete sich durch die Austauschreaktion ein Gleichgewicht und verursachte ein Endprodukt mit einer Größe von ca. 8.3 kDa (siehe Abb. 15). Eine andere Möglichkeit ist, dass das große Copolymer nicht stabil und langsam abgebaut ist und der kleine PEG-PEI-Block durch Dialysemembran diffundiert ist.

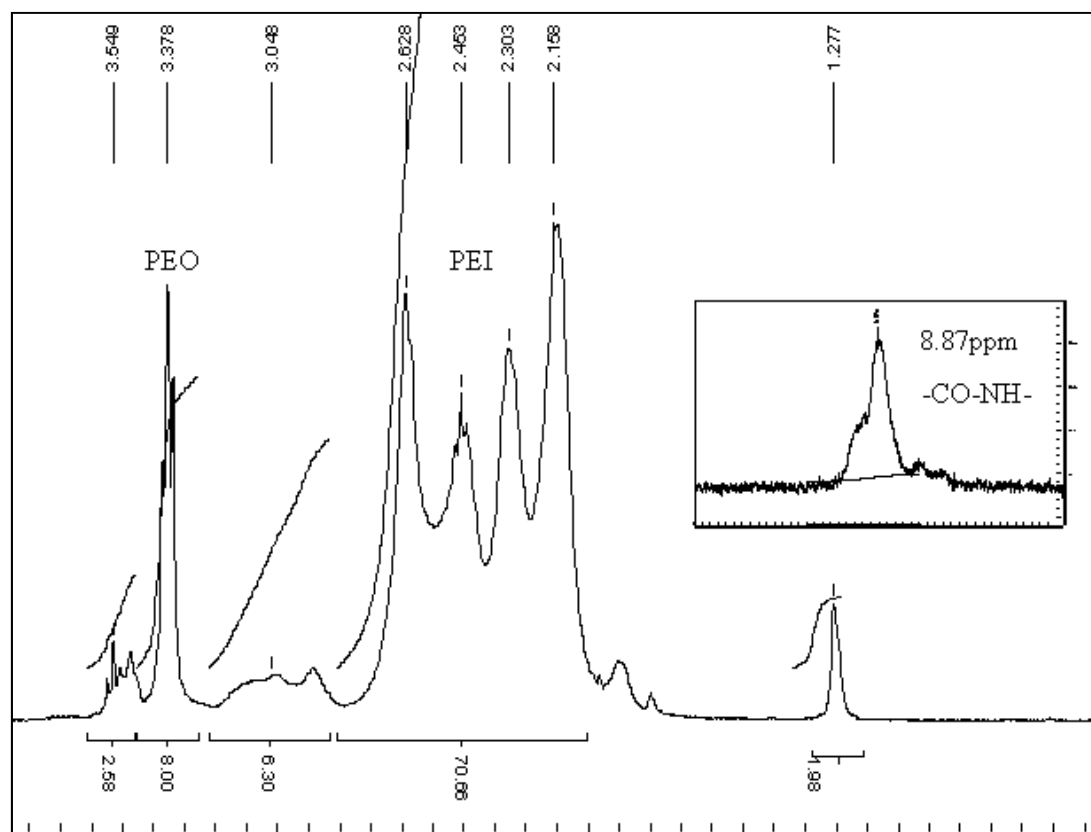


Abb. 16 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) des Produkts bei Polymerisation mit $\text{SAT}(\text{PEO})_4$.

Kinetik-Untersuchung:

Es wurde die Kinetik des Reaktionsverlaufs bei der Oxidationsstufe der Disulfid-Bindung am UV-Spektrometer vermessen. Durch Anwendung des Ellman's Reagenz wurde die freie Thiol-Gruppe in der Reaktionslösung bestimmt. Da die SH-Gruppe nach der Freisetzung durch Hydroxyamin an Sauerstoff langsam dimerisieren kann, wurde die Kinetik bei Bildung des Disulfids in Ab- und Anwesenheit von DMSO untersucht. Die entsprechende Halbwertszeit zeigte, dass die Reaktion ohne DMSO ($t_{1/2} = 50.3 \text{ h}$) viel langsamer als mit DMSO ($t_{1/2} = 7.6 \text{ h}$) läuft. Die Zugabe von DMSO beschleunigte die Bildung des Disulfids und verkürzte somit die Reaktionszeit.

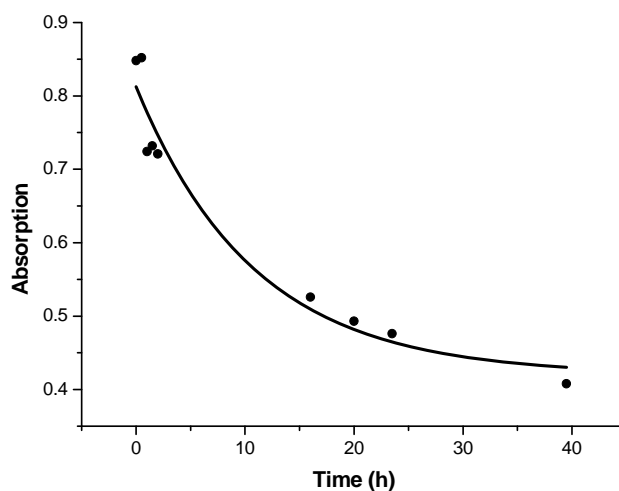


Abb. 17 Kinetik-Untersuchung nach Zugabe von $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in Abwesenheit von DMSO ($t_{1/2} = 50.3$ h).

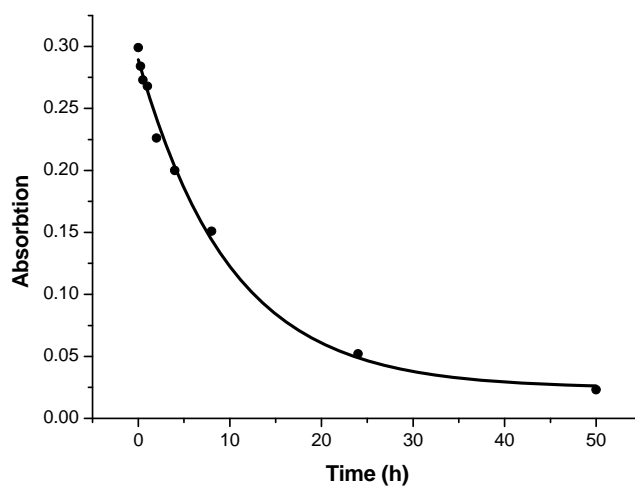


Abb. 18 Kinetik-Untersuchung nach Zugabe von $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in Anwesenheit von DMSO ($t_{1/2} = 7.6$ h).

Optimierung:

Zur Optimierung der Polymerisation wurden die Reaktionen bei unterschiedlichen Faktoren durchgeführt. Das DMSO wurde als Oxidationsmittel bei der Konzentration von 5 %, 10 % und 20 % eingesetzt. Das Verhältnis zwischen PEG und PEI im Ansatz wurde zwischen 1.5:1 und 4:1 variiert. In den beiden Fällen wurde davon kein signifikanter Einfluss auf die Größe des hergestellten Polymers beobachtet.

Ausreichende Reaktionszeit ist für den vollständigen Reaktionsverlauf vermutlich notwendig. Daher wurden die Kupplungsstufen zwischen PEG und PEI sowie die Oxidationsstufe der Thiol-Gruppen jeweils über 2 Tage durchgeführt.

Da die NHS-Gruppe hydrolyselabil ist, wurde die Kupplung zwischen PEG und PEI in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. In Chloroform erhielt man das Produkt mit einer Größe von 9.5 kDa, welches vergleichbar ist mit dem in Puffer hergestellten Endprodukt.

Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wurde das gewünschte PEG-PEI-Copolymer durch Anwendung von SAT(PEO)₄ hergestellt. Die Größe des Copolymers vor und nach der Dialyse ist unterschiedlich. Die Austauschreaktion zwischen Disulfid-Bindung bei verschiedenen Polymergrößen könnte dafür verantwortlich sein. Das dadurch produzierte Polymer besitzt eine Größe von 8.3 kDa, was auf eine relativ kurze Polymerkette hinweist. Der genaue Reaktionsmechanismus, z.B. die Kontrolle der Polymergröße sowie mögliche Einflussfaktoren auf die Copolymerisation, ist noch nicht ausführlich untersucht. Dennoch liefert diese Synthesestrategie durch Anwendung eines PEGhaltigen Linkers eine Möglichkeit für die Herstellung des PEG-PEI-Copolymers. Unter Berücksichtigung der hohen Kosten des Linkers SAT(PEO)₄ wurden einige Linker mit ähnlichen Strukturen und funktionalen Gruppen synthetisiert.

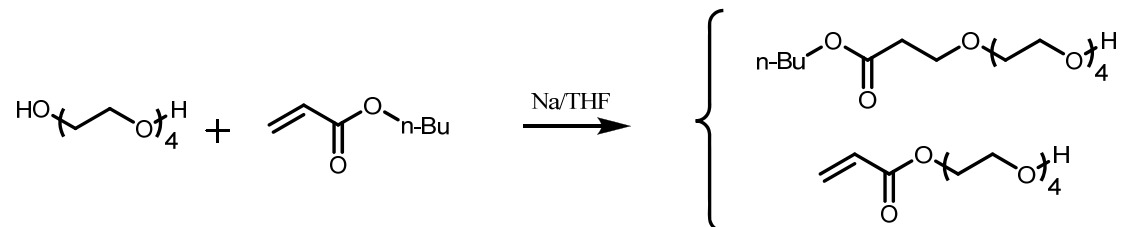
3.1.2.1.2 Polymerisation mit Linker AcS-PEG-COOH

Herstellung des Linkers AcS-PEG-COOH:

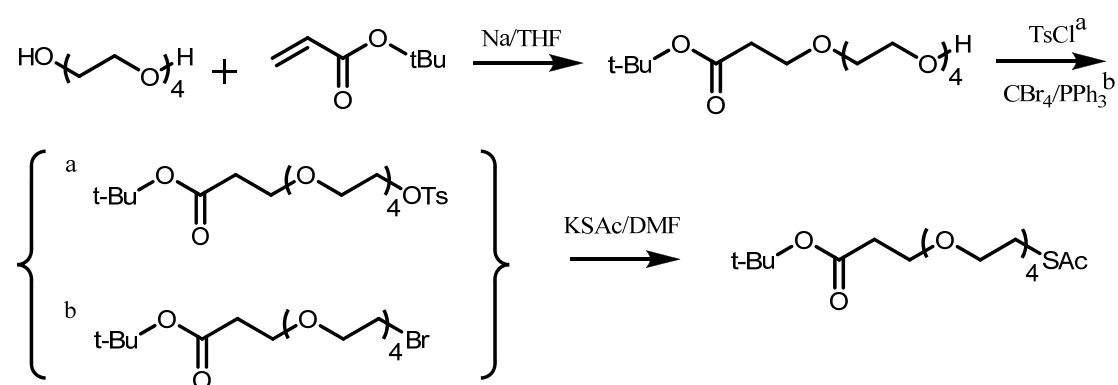
Die Herstellung von AcS-PEG-COOH beruht auf die Tatsache, dass das PEG-PEI-Copolymer durch Anwendung des Linkers SAT(PEO)₄ synthetisiert wurde. Da die NHS-Gruppe hydrolyselabil und somit schwer aufzubewahren ist, wurde eine der funktionalen Gruppen des Linkers statt NHS mit einer Carbonsäure modifiziert. Da ein NHS-Ester als eine aktivierte Form einer Carbonsäure betrachtet werden kann,

ist das Kupplungsprodukt identisch mit dem zwischen Carbonsäure und Amin. Einige mögliche Methoden zur Herstellung von AcS-PEG-COOH wurden angewendet.

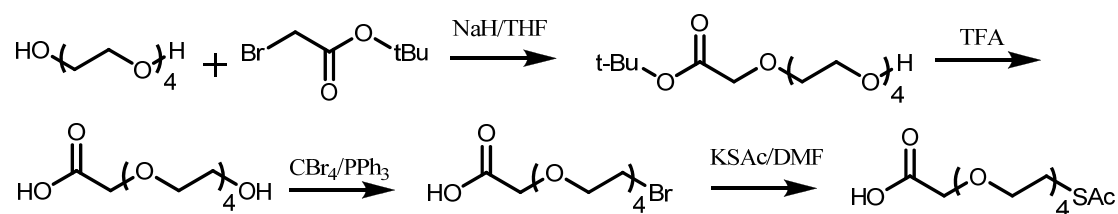
Methode I



Methode II



Methode III



Methode IV

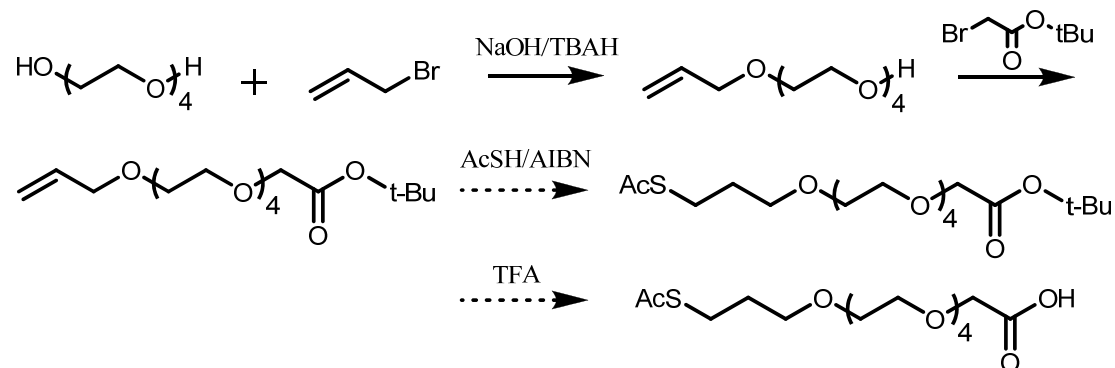


Abb. 19 Vier unterschiedliche Synthesemethoden für die Herstellung von AcS-PEG-COOH ausgehend von Tetraethylenglykol.

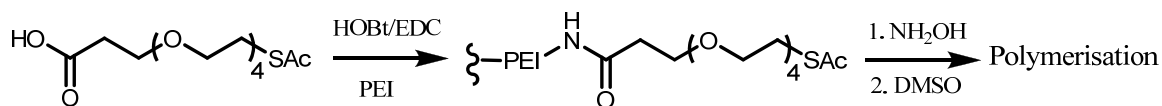
Die Herstellung von AcS-PEG-COOH fand ausgehend von Tetraethylenglykol (TEG) statt. Die Einführung der monosubstituierten Carbonsäuregruppe wurde zuerst durch Michael-Addition mit Butylacrylat und die anschließende Hydrolyse der Butylester realisiert (siehe Abb. 19, Methode I) [99]. Bei der Anwendung von n-Butylacrylat fand noch die Veresterung von TEG als Nebenreaktion statt. Das daraus resultierende Tetraethylenglykolacrylat ist das Isomer vom Additionsprodukt. Daher konnten beiden Produkte durch Säulenchromatographie nicht getrennt werden. Destillation unter Hochvakuum ist ebenfalls nicht möglich, da die Siederpunkte beider Produkte höher als 180 °C sind, würde die Vinyl-Gruppe polymerisiert. Nach Hydrolyse des Esters ist es möglich beide Substanzen durch chromatographische Methoden abzutrennen. Allerdings würde die Ausbeute erniedrigt. In Methode II wurde tert-Butylacrylat statt n-Butylacrylat eingesetzt [99]. Dabei wurde keine Nebenreaktion beobachtet. Vermutlich trat sie wegen der sterischen Hinderung der tert-Butyl-Gruppe nicht ein. In dieser Reaktion wies das tert-Butylacrylat eine bessere Chemoselektivität als das n-Butylacrylat auf.

Die Umsetzung zu Thioacetat, welches als die andere funktionale Gruppe in PEG-Ketten fungiert, erfolgte durch zwei Methoden. Zur Aktivierung der freien Hydroxyl-Gruppe wurde sie entweder durch eine OTs-Gruppe ersetzt oder mit Tetrabromomethan in Gegenwart von Triphenylphosphin zu Bromid umgesetzt. Beide Substituenten konnten anschließend mit Kaliumthioacetat durch Kochen bei 60 °C in DMF ins Thiolacetat umgewandelt werden. Nach der Entfernung von tert-Butyl-Gruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) wurde der erwünschte Linker AcS(PEO)₅COOH hergestellt. Nach Veresterung mit NHS würde dieser Linker dieselbe Struktur wie das kommerzielle SAT(PEO)₄ besitzen. Im Hinblick auf die hydrolyselabile Eigenschaft der NHS-Gruppe, wurde der Linker ohne weitere Modifizierung zur anschließenden Polymerisation verwendet.

In Methode III wurde der monosubstituierte tert-Butylester von Tetraethylenglykol mit tert-Butylbromoacetat in Gegenwart von Natriumhydrid dargestellt [100]. Nach der Esterspaltung mit TFA wurde die freie Hydroxygruppe durch Bromierung und anschließende Umsetzung mit Kaliumacetat ins Thioacetat umgewandelt. Der so hergestellte Linker mit der Struktur von $\text{AcS(PEO)}_4\text{CH}_2\text{COOH}$ hat die gleichen funktionalen Gruppen wie der über Methode II hergestellte. Im Vergleich zu der Struktur fehlt einem Kohlenstoff in der Kette, was die Kupplung mit PEI sowie die anschließende Polymerisation nicht beeinflusst.

In Methode IV wurde eine der Hydroxylgruppen der TEG-Ketten mit Allylbromid in einer Vinylgruppe umgesetzt [101]. Die andere Hydroxylgruppe wurde dann mit tert-Butylbromoacetat in einen Butylester umgewandelt. Die Vinylgruppe konnte weitehin mit Thiolessigsäure (AcSH) unter UV-Licht zu Thioacetat umgesetzt werden [102]. Nach der Abspaltung des Butylesters mit TFA könnte der erwünschte Linker mit der Struktur $\text{AcSCH}_2(\text{PEO})_5\text{CH}_2\text{COOH}$ dargestellt werden. Bei der Additionsstufe mit Thiolessigsäure wurde UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm verwendet. Nach Bestrahlung über 2.5 h hat das Edukt zum geringen Teil reagiert. Daher könnte eine längere Bestrahlung für einen vorständigen Umsatz ins Produkt nötig sein. Unter Berücksichtigung der uneffizienten Leistung dieser Reaktion, wurde diese Methode nicht weiter durchgeführt.

Zusammenfassend wurden vier Methoden zur Darstellung des bifunktionalen Linkers von AcS-PEG-COOH angewendet. Alle vier Methoden sind durchführbar. Abgesehen von der NHS-Gruppe, hat der aus Methode II dargestellte Linker die gleiche Struktur wie der kommerzielle Linker SAT(PEO)_4 . Dieser Linker wurde hauptsächlich für die weitere Polymerisation mit Polyethylenimin angewendet.

Polymerisation:Abb. 20 Polymerisation mit Linker AcS(PEO)₅COOH.

Ähnlich wie der Linker SAT(PEO)₄ wurde der in Methode II hergestellte Linker AcS(PEO)₅COOH zuerst mit PEI gekoppelt und dann nach der Freisetzung des Thiols durch Bildung der Disulfid-Bindung in DMSO durch den kurzen PEG-PEI-Block miteinander verknüpft. Die Aktivierung der Carbonsäuregruppe wurde während der Kupplung mit dem Amin durchgeführt. Im Gegensatz zu SAT(PEO)₄ wurde statt NHS-Gruppe die Reagenzien HOBt/EDC verwendet, da das Hydroxybenzotriazol unempfindlich gegen Hydrolyse ist.

Es wurde lineares PEI 2500 und verzweigtes PEI 2000 für die Copolymerisation eingesetzt. Als Lösungsmittel wurde trocknes DMSO verwendet, um die mögliche Hydrolyse zu vermeiden. Da das Verhältnis zwischen PEG und PEI, sowie die Reaktionskonzentration die molekulare Masse des Produkts beeinflussen könnten, wurde das Verhältnis von PEG/PEI zwischen 2 und 4.6 und die Konzentration zwischen 16 mg/mL und 50 mg/mL bezüglich des PEI-Anteils variiert. Wie in Tabelle 3 angegeben wurde bei der GPC-Analyse (SEC-MALLS) kein hochmolekulares Polymer beobachtet. Das größte Polymer ist bei der Verwendung von linearem PEI 2500 mit einem PEG/PEI-Verhältnis von 4.6 aufgetreten. Mit einer Größe von 7.3 kDa sollte das Copolymer einer Struktur von zwei miteinander gekoppelten PEG-PEI-Blocks entsprechen. Hierbei wurde keine signifikante Abhängigkeit von der Variation der Konzentration sowie der Ansatzverhältnisse beobachtet. Die PEG-PEI-Copolymerisation wurde als Eintopf-Reaktion und als Stufenreaktionen durchgeführt. Die Stufenreaktion erhält eine Stufe zur Kupplung zwischen PEG und PEI durch Amid-Bildung und eine des Kettenwachstums durch Disulfid-Bildung. Es

wurde versucht die Reihenfolge beider Stufen auszutauschen. Das Kettenwachstum erfolgte durch Amid-Bildung oder Disulfid-Bildung. Dadurch wurde kein optimiertes Ergebnis erhalten.

Tabelle 3. Synthese mit Linker $\text{AcS(PEO)}_4\text{CH}_2\text{COOH}$

Reaktion	PEI	Ansatz (PEI, L/P)	Konz. (mg/mL)	GPC
1	2500, <i>l</i>	478.0 mg (1/3.0)	24	6.5 kDa
2	2500, <i>l</i>	399.7 mg (1/3.9)	20	5.6 kDa
3	2500, <i>l</i>	399.8 mg (1/4.6)	20	7.3 kDa
4	2000, <i>br</i>	506.0 mg (1/2.5)	17	4.5 kDa
5	2000, <i>br</i>	580.1 mg (1/4.0)	29	3.7 kDa
6	2000, <i>br</i>	412.1 mg (1/4.0)	16	2.8 kDa
7	2000, <i>br</i>	50.1 mg (1/4.0)	50	1.3 kDa

L/P: Linker/PEI (molar ratio);

Im Vergleich zu dem Linker SAT(PEO)_4 zeigte das $\text{AcS(PEO)}_5\text{COOH}$ weniger Kupplungsfähigkeit. Die vorherige Aktivierung der Carbonsäuregruppe, z.B. Veresterung mit NHS, ist vermutlich nötig zur Erhöhung der Polymerisationsfähigkeit.

3.1.2.2 Blockcopolymerisation von PEG-PEI durch Reduktion von Imin

In diesem Experiment wurde versucht einem Aldehyd statt einer Carbonsäure als funktionale Gruppe für die Kupplung mit PEI zu Verwenden. Durch Bildung eines Imins mit dem Amin wurde der Aldehyd in Gegenwart von NaCNBH_3 zur C-N-Einfachbindung umgesetzt. Im Vergleich zu Amid ist C-N-Bindung stabiler und nicht spaltbar. Daher ist die Kupplungseffizienz im Vergleich zum Amid höher. Es wurden zwei Linker mit den Strukturen $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ und $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ hergestellt. Mit $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ wurde die Copolymerisation durch Bildung eines Disulfids nach Kupplung an PEI und anschließende Freisetzung von Thiol erzielt. Der Linker $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ könnte direkt mit PEI durch Reduktion des Imins mit NaCNBH_3 copolymerisieren.

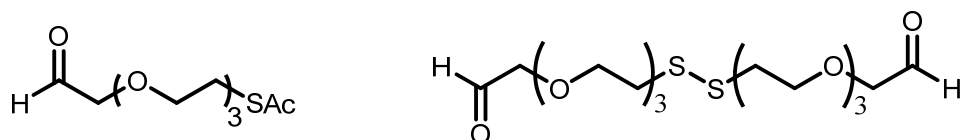


Abb. 21 Struktur der Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ und $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$.

3.1.2.2.1 Polymerisation mit $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$

Herstellung des Linkers $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$:

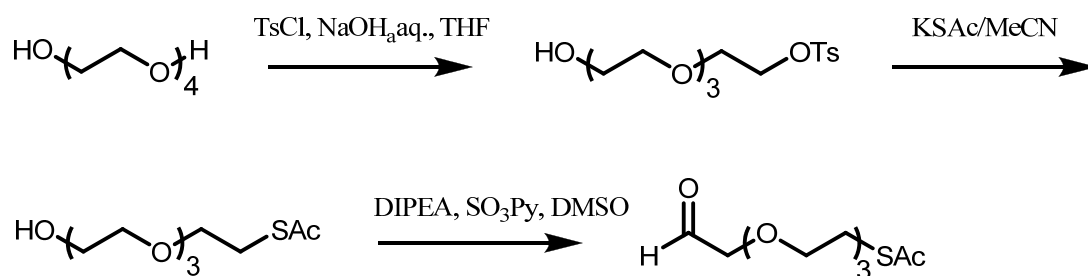


Abb. 22 Herstellung des Linkers $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$.

Die Herstellung des Linkers $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ erfolgte in vier Reaktionsstufen ausgehend von TEG. Das TEG wurde zuerst mit Tosylgruppe monosubstituiert [103], welche als Abgangsgruppe für die Umsetzung in Thiolacetat eingesetzt wurde. Die andere Hydroxygruppe in der TEG-Kette wurde durch Oxidation von Sulfurtrioxid-Pyridin ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) in Gegenwart der Hünig Base (Diisopropylethylamin, DIPEA) in das Aldehyd umgesetzt. So wurde der bifunktionale Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ erfolgreich dargestellt. Die Struktur des Linkers wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und IR-Spektrum charakterisiert.

Polymerisation:

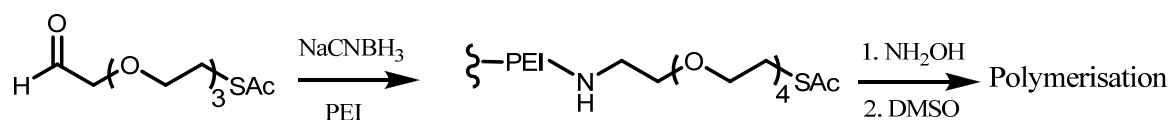


Abb. 23 Polymerisation mit Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$.

Die Darstellung des gewünschten PEG-PEI-Blockcopolymers wurde in zwei Reaktionsstufen durchgeführt. Der PEGhaltige Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ wurde zuerst an PEI gekoppelt. Der Aldehyd bildete zuerst mit dem Amin ein Imin. Für die Reduktion des Imins zum Amin wurde Natriumcyanoborohydrid als ein mildes Reduktionsreagenz bei schwach-sauerem Bedingungen (pH 5.5~6.5) angewendet. Das Thiol wurde durch Hydroxylamin freigesetzt. Das Anwachsen der Polymerketten erfolgte durch Disulfid-Bildung. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus MeOH und PBS-Puffer (pH 7.4) angewendet, damit die Löslichkeit des Linkers verbessert und der pH-Wert für die Reduktion kontrolliert werden konnte.

Für die Copolymerisation wurden hierbei das verzweigte PEI 2000 und das lineare PEI 2500 verwendet. Das molare Verhältnis von PEG/PEI beim Ansatz beträgt 4. Die durch Berechnung mittels ^1H -NMR-Spektrum nach Kupplung von PEGPEI bei Verwendung von PEI 2000 ergab 1.9. Es wurden ca. 50 % des PEG-Linkers erfolgreich an PEI gekoppelt (siehe Abb. 24).

Tabelle 4. Synthese mit Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$.

Reaktion	PEI	Ansatz (PEI, L/P)	Konz. (mg/mL)	GPC
Versuch 1	2000, <i>br</i>	1.0 g (1/4.0)	33	380 kDa, 38 kDa
Versuch 2	2500, <i>l</i>	0.5 g (1/4.1)	17	8.3 kDa

L/P: Linker/PEI (molar ratio)

Das NMR-Spektrum zeigt ein PEG/PEI-Verhältnis von ca. 1.9:1. Die Signale zwischen 2.6 und 3.0 ppm gehören zu PEI, die zwischen 3.0 und 3.3 ppm zu PEG.

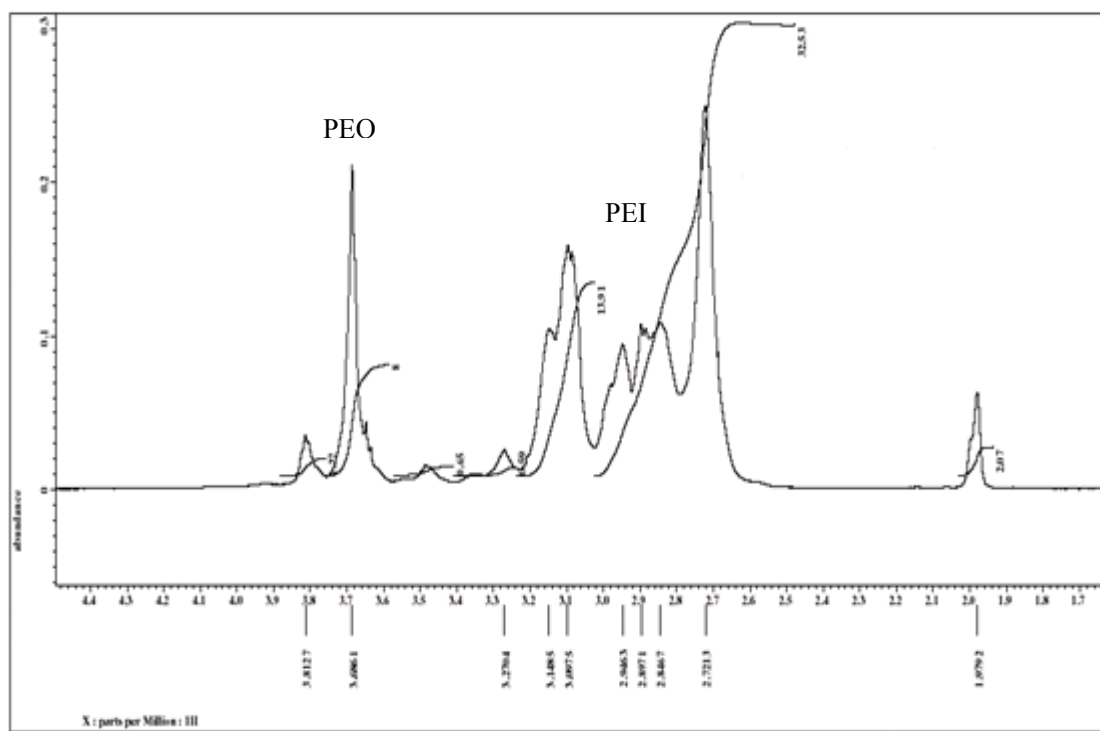


Abb. 24 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) des mit Linker $(\text{AcS}(\text{PEO})_3\text{CH}_2\text{CHO})$ modifizierten PEG-PEI-Blocks vor der Polymerisation. Das aus den Integralen errechnete PEG/PEI-Verhältnis beträgt ca. 1.9:1.

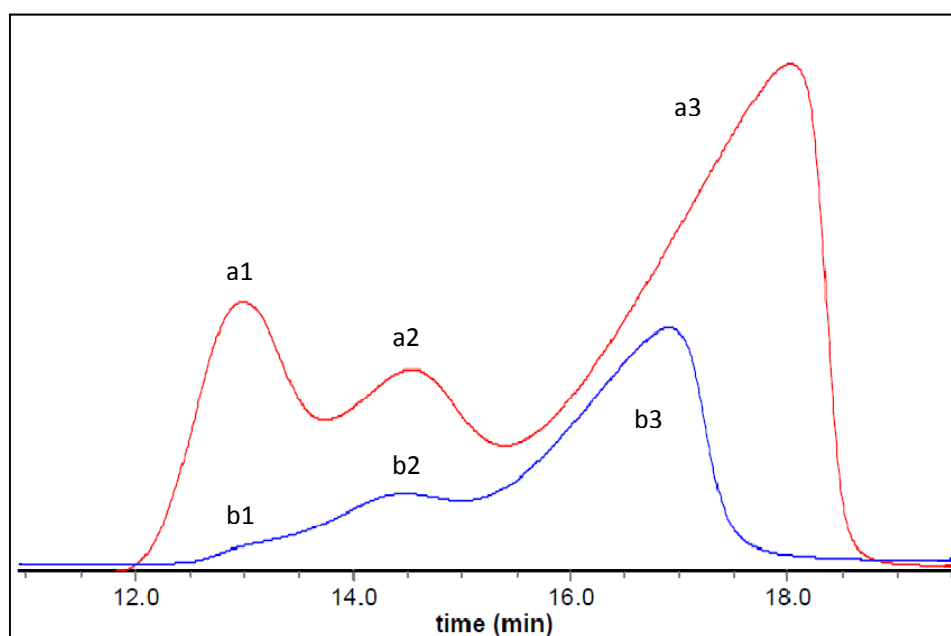


Abb. 25 GPC-Chromatogramm des Polymerisationsprodukts bei Anwendung von PEI 2000. (a: direkt nach Reinigung; b: zwei Wochen nach Reinigung.)

Das Polymerisationsprodukt bei Anwendung von PEI 2000 wurde nach der Dialyse mittels GPC (SEC-MALLS) charakterisiert. Die Stabilität des Produkts wurde jeweils nach zwei Wochen und zwei Monaten mittels GPC bestimmt. Aus dem GPC-Chromatogramm (siehe Abb. 25) geht hervor, dass die Größe des Produkts sich mit der Zeit veränderte. Direkt nach der Dialyse durch 1000 Da Membran erhielt man eine Polymermischung aus drei Komponenten, deren aus dem GPC ermittelte Größen jeweils 380 kDa, 38 kDa und 3.7 kDa entsprechen (siehe Abb. 25a). Zwei Wochen später (siehe Abb. 25b) ist zu beobachten, dass Peak a1 fast vollständig verschwunden ist, während Peak a2 sich auch verkleinerte. Ein signifikanter Abbau des Polymers wurde beobachtet. Nach zwei Monaten ist nur der Peak a3 noch vorhanden. Das Polymer ist vollständig abgebaut. Die schnelle Abbaubarkeit ist nötig für Anwendung als Carrier in der Gentherapie. Allerdings bringt sie auch Schwierigkeiten bei Reinigung und Aufbewahrung des Produkts mit sich. Mit dieser Copolymerisationsmethode wurde folglich noch kein reines, stabiles und hochmolekulares Polymer erhalten.

Durch Copolymerisation mit linearem PEI 2500 erhielt man das PEG-PEI-Copolymer mit einer Größe von 8.3 kDa. Da reines lineares PEI 2500 aufgrund der sterischen Struktur zu hohe GPC-Ergebnisse (SEC-MALLS) von ca. 3~4 kDa zeigt, enthält das Produkt wahrscheinlich zwei miteinander gekoppelte PEI-Ketten.

3.1.2.2.2 Polymerisation mit $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$

Herstellung des Linkers $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$:

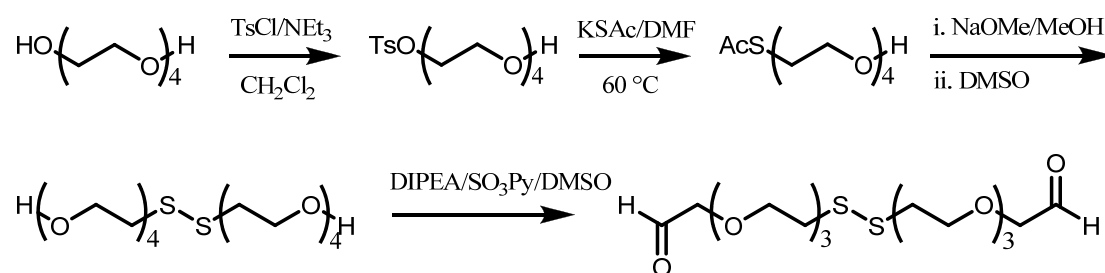


Abb. 26 Herstellung des Linkers $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$.

Die Darstellung des Linkers $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ erfolgte in vier Reaktionsstufen ausgehend von TEG. Ähnlich wie in 3.1.2.2.1 beschrieben wurde eine Hydroxylgruppe von TEG mit Thiolacetat umgesetzt. Mit einer Natriummethanolat-Lösung in trockenem MeOH wurde das Thiol aus Thiolacetat freigesetzt. Die anschließende Zugabe von DMSO konnte das freigesetzte Mercaptan direkt ins Disulfid umsetzen. Danach wurde die verbleibende Hydroxylgruppe der PEG-Kette mit Sulfurtrioxid-Pyridin in Gegenwart der Hünig Base in den Aldehyd oxidiert. Nach der Reinigung erfolgte die Herstellung dieser disulfidhaltigen PEG-Linker mit zwei Aldehyd-Gruppen. Die Struktur wurde mittels ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, und IR-Spektren charakterisiert.

Polymerisation:

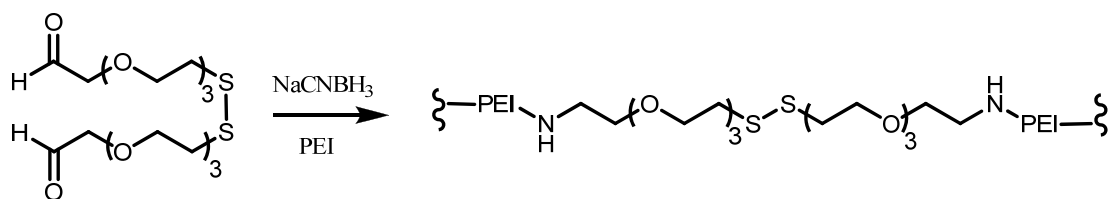


Abb. 27 Polymerisation mit Linker $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$.

Es wurde verzweigtes PEI 2000 für die Copolymerisation mit dem Linker $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ angewendet. Im Unterschied zu 3.1.2.2.1 wurde das Disulfid während der Linkersynthese gebildet. Der Linker $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ trägt einen Aldehyd als einzige funktionale Gruppe. Das Kettenwachstum würde durch Imin-Bildung zwischen Aldehyd und Amin und anschließende Reduktion des Imins wieder zum Amin erfolgen.

Diese Stufe wurde jeweils bei sauren Bedingungen (pH 5~6) und basischen Bedingungen (pH 10~11) durchgeführt. Das Ansatzverhältnis zwischen Linker und PEI beträgt 10:1, um ein möglichst hohes Molekulargewicht zu erzielen. Das GPC-Chromatogramm nach dieser Kupplungsmethode zeigte kein hochmolekulares Polymer. Die Reaktionsbedingungen (z.B. der pH-Wert bei Reduktion des Imins in

Gegenwart von NaCNBH_3) könnten entscheidend für das Gelingen dieser Blockcopolymerisationsmethode sein.

3.1.2.3 Polymerisation mit $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$

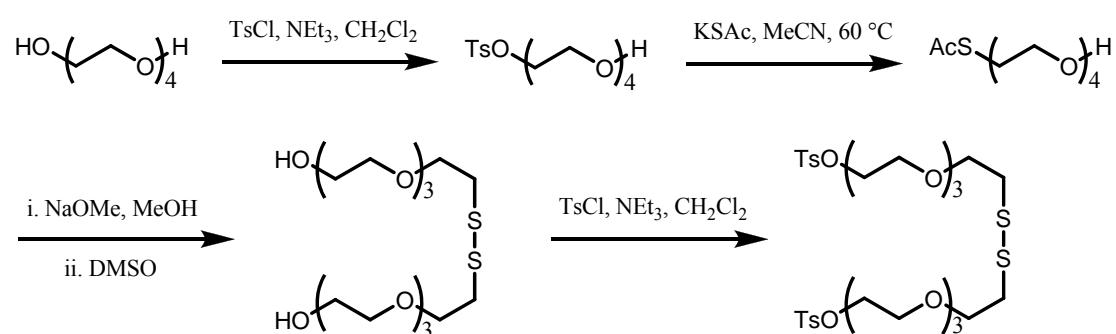


Abb. 28 Herstellung des Linkers $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$.

Die Darstellung des Linkers $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ erfolgte ausgehend von TEG in vier Reaktionsstufen (siehe Abb. 28). Eine Hydroxylgruppe in der PEG-Kette wurde zuerst durch eine Tosylgruppe modifiziert, welche dann mit Thiolacetat umgesetzt wurde. Das Thiolacetat wurde dann über Natriummethoxid zu freier Thiol-Gruppe umgesetzt. Nach Zugabe von DMSO wurde die Disulfid-Brücke gebildet. Abschließend wurde die andere Hydroxylgruppe auch zu einer Tosylgruppe umgesetzt. So wurde der tosyl-modifizierte, disulfidhaltige Linker dargestellt.

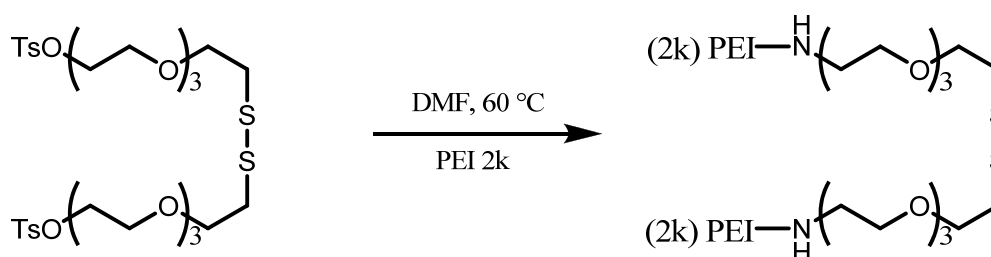


Abb. 29 Polymerisation mit $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$.

Die Polymerisation von verzweigtem PEI 2000 mit dem tosyl-modifizierten PEG-Linker basiert auf der Tatsache, dass die Tosylgruppe beim Erwärmen durch

nukleophilen Angriff des Amins abgespalten und in ein neues Amin umgesetzt werden kann. Hierbei erfolgte die Copolymerisation in DMF bei 60 °C mit einem Linker/PEI-Ansatzverhältnis von 1:10. Das resultierende Produkt wurde während des Reaktionsverlaufs nach 25 h und 116 h mittels GPC (SupremaMax, RI-Detektor) analysiert.

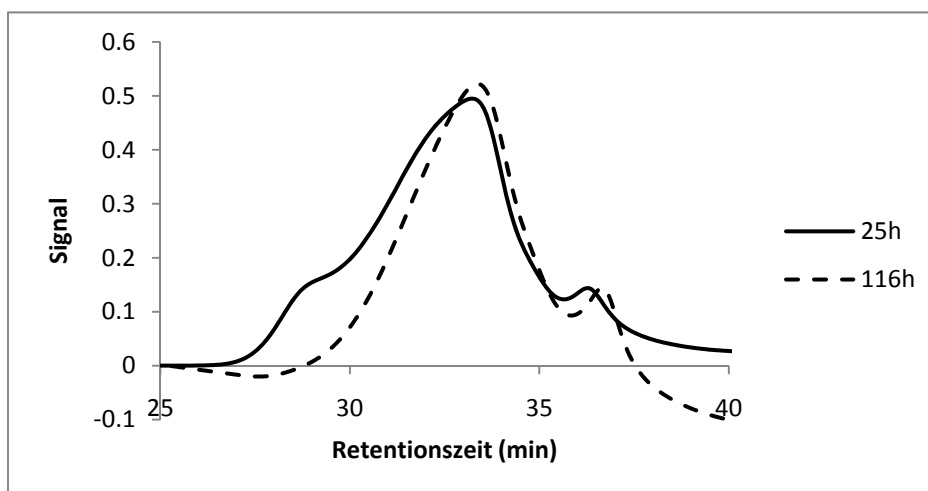


Abb. 30 GPC-Chromatogramme des Polymerisationsprodukts bei Reaktionszeiten von 25 h und 116 h.

Aus dem GPC-Chromatogramm wird deutlich, dass bei 25 h hauptsächlich drei Peaks beobachtet wurde. Die Peaks bei ca. 33 min und 36 min besitzen eine Größe von 2000 Da, welche dem nicht polymerisierten Teil entspricht. Der Peak bei ca. 29 min besitzt eine Größe von ca. 250 kDa, was eine erfolgreiche Copolymerisation zwischen PEI- und PEG-Block andeutet. Bei 116 h ist dieser Peak verschwunden. Vermutlich ist das Produkt durch Austausch zwischen Disulfid-Bindungen oder durch Abbau des Disulfids instabil, was Schwierigkeiten bei der Aufreinigung sowie der Aufbewahrung des Produkts mit sich bringt. Verbesserte Reaktionsbedingungen oder Copolymerisationsmethoden sind erforderlich, damit ein vollständiger Polymerisationsprozess zu einem stabilen Produkt erzielt werden kann.

3.1.3 Synthese eines bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymers durch Kupplung mittels Click-Chemie

Ziel war es, ein bioabbaubares Polyethylenimin durch Vernetzung mit Disulfid-Bindungen herzustellen. Die Effizienz der Transfektion als auch die Toxizität von PEI nehmen mit dem Molekulargewicht zu. Darum entstand die Idee, ein hochmolekulares PEI bestehend aus niedermolekularem Bausteine zu synthetisieren. Dieses bioabbaubare Produkt sollte hohe Transfektionseffizienz mit niedriger Toxizität vereinen. Aufgrund der Reversibilität der Disulfid-Brücke im Lysosom wurde Disulfid zur Erhöhung der Bioabbaubarkeit des Carriers eingeführt. Daher ist die Anwendung von Disulfiden attraktiver im Vergleich zu Ester- und Amid-Bindungen.

Click-Chemie ist eine der einfachsten und effizientesten Methoden zur Blockcopolymerisation von zwei beliebigen Homopolymerblöcken. Hierbei wurde die Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition für die Blockcopolymerisation von Polyethylenimin und Polyethylenglykol angewendet. Zuerst wurde die Disulfid-Bindung in die PEG-Kette eingeführt, um Abbaubarkeit zu erzielen. Dann erfolgte Blockcopolymerisation von PEG-PEI nach der Alkin-Modifizierung an PEI und der Azid-Modifizierung an PEG. In dieser Arbeit wurde zuerst die Copolymerisation von reinem niedermolekularen PEI über Click-Chemie als Modellversuch durchgeführt. Danach wurde der disulfidhaltige PEG-Linker zur Herstellung des erwünschten ‚völlig‘ bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymers dargestellt.

3.1.3.1 Synthese von Disulfid-Brücken enthaltenden Polyethylenimin durch Kupplung mit Click-Chemie.

3.1.3.1.1 Synthese von PEI-SS-PEI über Click-Chemie mit Linker A

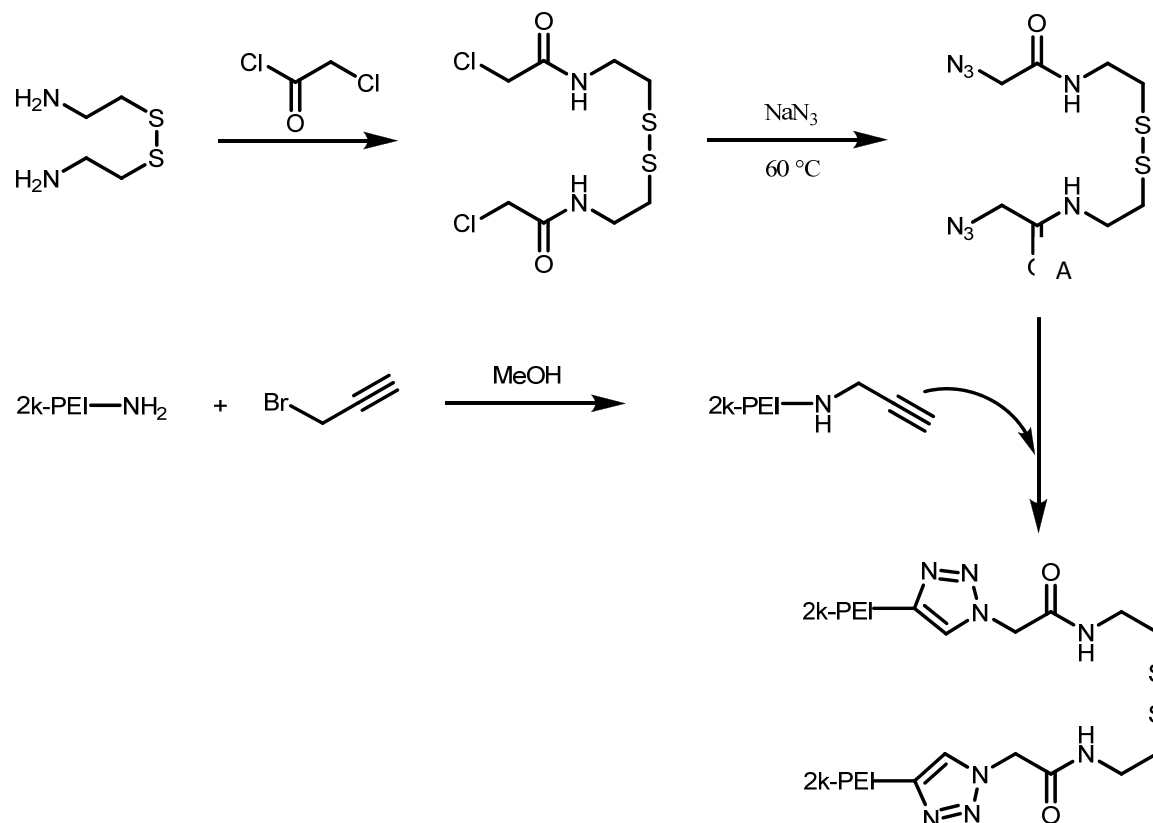


Abb. 31 Synthese von PEI-SS-PEI mit Linker A.

Die Synthese von mit Disulfid verknüpften Polyethylenimin erfolgte in drei Stufen. Die Darstellung eines azid-modifizierten, disulfidhaltigen Linkers, die Modifizierung von Polyethylenimin mit Alkin und die Kupplung zwischen Alkin und Azid mittels Huisgen 1,3-dipolar Cycloaddition.

Wie in Abb. 31 gezeigt wurde der mit Azid modifizierte Linker A ausgehend von Cystamin dargestellt, welches die erwünschte Disulfid-Bindung enthält. Das Cystamin wurde zuerst mit Chloracetylchlorid acyliert und dann durch Substitution

mit Natriumazid ins N,N'-(2,2'-disulfanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(2-chloro-acetamid) umgesetzt [103]. Das verzweigte PEI 2000 wurde durch Anwendung von Propargylbromid mit dem Alkin modifiziert. Unterschiedliche Ansatzverhältnisse zwischen PEI und Alkin wurden eingesetzt, um ihren Einfluss auf die Größe des Polymerisationsprodukts zu untersuchen. Die Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition erfolgte dann zwischen dem Azid-Disulfid-Linker und dem alkin-modifizierten PEI in Gegenwart von Cu(I), welches *in situ* durch Reduktion von Cu(II) mit Natriumascrobat hergestellt wurde. Das molare Verhältnis zwischen Alkin und Azid betrug überwiegend 1:1. Bei der Polymerisation mit einem Ansatzverhältnis von PEI und Alkin von 1:20 betrug es jedoch 2:1 (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Ansatz und GPC-Ergebnis für Polymerisation von mit Alkin modifiziertem PEI (2 k) und Linker A über Click-Chemie.

PEI : Alkin (mol/mol)	PEI 2k (mg)	MeOH : H ₂ O (v/v)	CuSO ₄ (mol % gegen Alkin)	Mw (aus GPC)
1:5 ^a	51.4	5:2	5	< 2 kDa
1:7 ^a	36.8	5:2	5	< 2 kDa
1:10 ^a	66.2	2:1	5	2.4 MDa
1:12 ^a	54.3	5:3	10	2.3 MDa
1:15 ^a	42.8	5:3	10	Vernetzung
1:20 ^b	100	1:2.5	10	670 kDa, 25 kDa

a: Alkin:Azid = 1:1; b: Alkin:Azid = 2:1.

Die Synthese von PEI-SS-PEI wurde bei unterschiedlichen Verhältnissen zwischen PEI und Alkin durchgeführt und über GPC-Chromatogramme analysiert. Hierbei wurden alle Proben mit SupremaMax-Säulen mit Hilfe des RI-Detektors untersucht. Da die hergestellten Polymere oder Copolymer alle PEI-Derivate sind, wurden die entsprechenden GPC-Ergebnisse nach der PEI-Standardkurve (siehe Abb. 32) ausgewertet und in Tabelle 5 angegeben. Als Standards wurden verzweigte PEI 800, 2000, 5000 und 25000 angewendet.

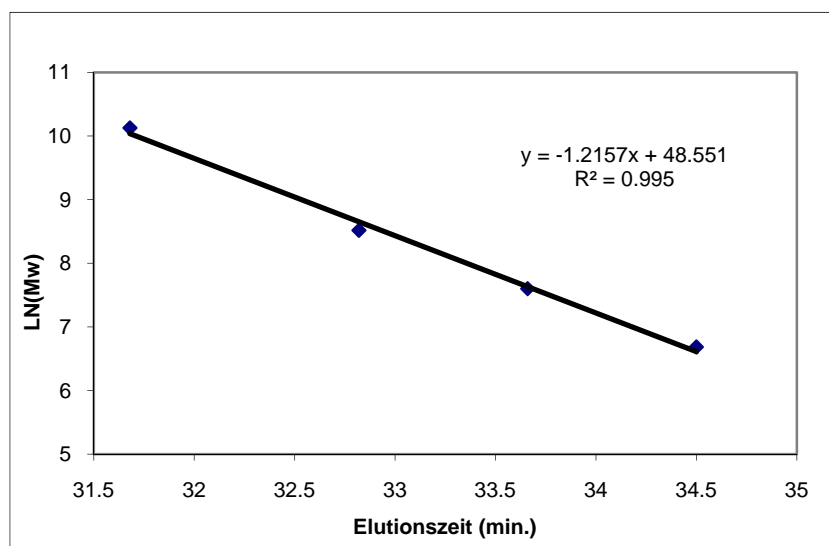


Abb. 32 Die PEI-Standardkurve für relative GPC-Messungen mit kombinierten Säulen von SupremaMAX 100 und SupremaMAX 3000 und einer Flussrate von 0.5 mL/min in 1 % Ameisensäure.

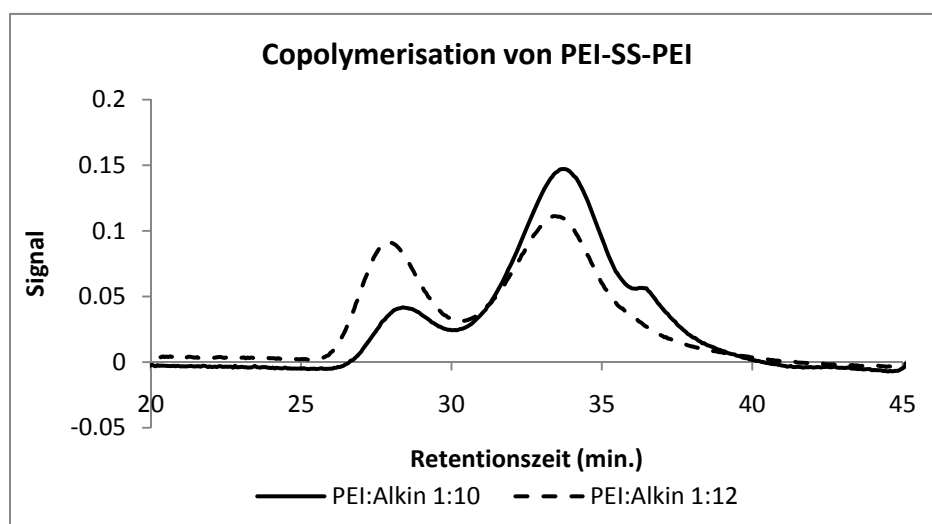


Abb. 33 GPC-Chromatogramme der Reaktionslösung zur Darstellung von PEI-SS-PEI bei Ansatzverhältnissen zwischen PEI und Alkin von 1:10 und 1:12.

Bei niedrigen Verhältnissen zwischen PEI und Alkin von 1:5 und 1:7 wurde kein Polymer größer als 2 kDa beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden Polymere größer als 10 kDa ab 1:10 hergestellt. Bei der Reaktion mit 1:15 fiel sofort ein brauner Niederschlag aus. Dieser löste sich nicht mehr in Wasser, MeOH, Chlorform und DMSO. Es handelt sich bei diesem Niederschlag um das gekoppelte PEI, welches

wegen Vernetzung unlöslich ist. Bei Ansatzverhältnissen von 1:10 und 1:12 zeigten die beiden Reaktionsmischungen ähnliche GPC-Chromatogramme mit zwei Produkten (siehe Abb. 33), deren molekulare Masse 2 MDa und 10 kDa entsprechen. Da das mit Alkin modifizierte PEI 2000 bei 1:10 ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 5 kDa besitzt, besteht das Produkt von 10 kDa durchschnittlich aus zwei PEI-Ketten. Das große Polymer von 2 MDa ist wahrscheinlich aus diesem Zwei-Ketten-PEI entstanden. Die Herstellung dieser großen Polymere benötigt vermutlich eine bestimmte Menge des an PEI gekoppelten Alkins. Daher wurde das große Polymer statt bei 1:5 und 1:7 erst bei 1:10 beobachtet. Im Chromatogramm (Abb. 33) ist deutlich zu sehen, dass bei 1:12 mehr Polymer mit großer Masse als bei 1:10 hergestellt wurde. Vermutlich wurde die Kupplungsmöglichkeit zwischen den PEI-Ketten wegen sterischer Behinderung ihrer verzweigten Struktur mit zunehmender Menge des an PEI gekoppelten Alkins erhöht.

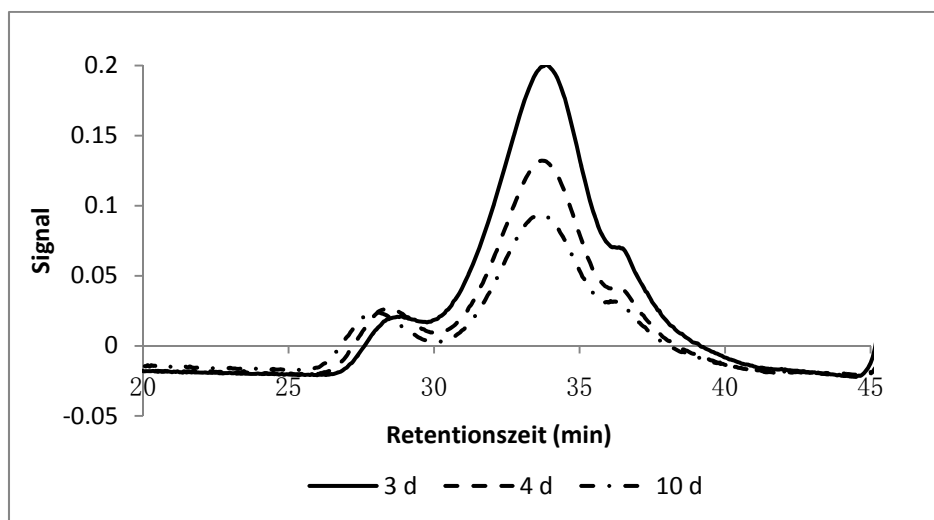


Abb. 34 GPC-Kontrolle nach der Reaktionszeit bei der Synthese von PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:10).

Es wurden die Reaktionsprodukte bei 1:10 mittels GPC kontrolliert (siehe Abb. 34). Das Wachstum des Polymers wurde beobachtet. Die molekularen Gewichte des größten Produkts betrugen jeweils 0.7 MDa, 1.5 MDa und 2.0 MDa entsprechend der Reaktionszeit von 3 d, 4 d und 10 d. Die Größe des Produkts nimmt mit der Reaktionszeit langsam zu.

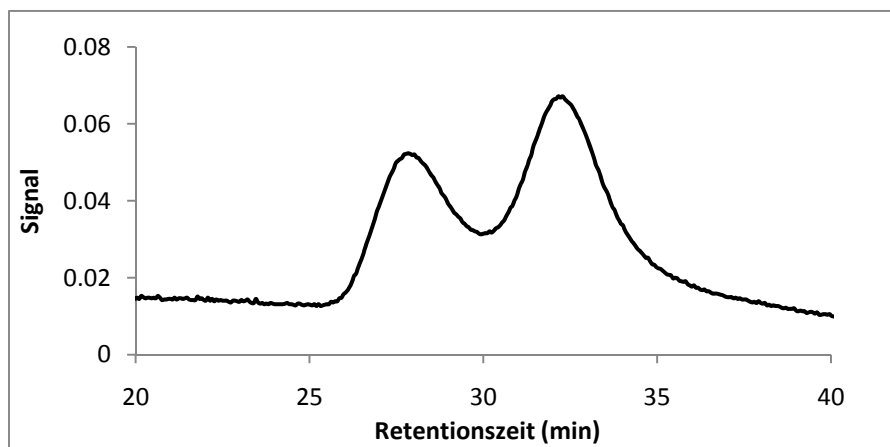


Abb. 35 GPC-Chromatogramm der Dialyseprodukte von PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:10).

Die Aufreinigung der Produkte erfolgte durch Dialyse in Wasser mit der Membran 1000 Da. Dadurch wurden die Verunreinigungen wie Lösungsmittel oder andere kleine Moleküle entfernt. Es wurden zwei Teile des Produkts beobachtet (siehe Abb. 35). Die Molekulargewichte von den beiden Produkten betragen 2.4 MDa und 12 kDa. Zum Trennen der beiden Produkte wurde diese Mischung in Wasser mit der Membran von 25 kDa dialysiert. Aber sie konnten nicht getrennt werden. Dann wurden die beiden Produkte in Wasser mit einer Membran von 100 kDa dialysiert. Das gereinigte Produkt besteht aus zwei Teilen. Das große Polymer hat eine Größe von 2.4 MDa mit einer Schulter von 50 kDa (siehe Abb. 36). Die Schulter konnte durch Dialyse nicht mehr getrennt werden. Das kleine Polymer besitzt eine Größe von 12 kDa (siehe Abb. 37), welches einer Struktur von 2 oder 3 gekoppelten PEI-Ketten entspricht.

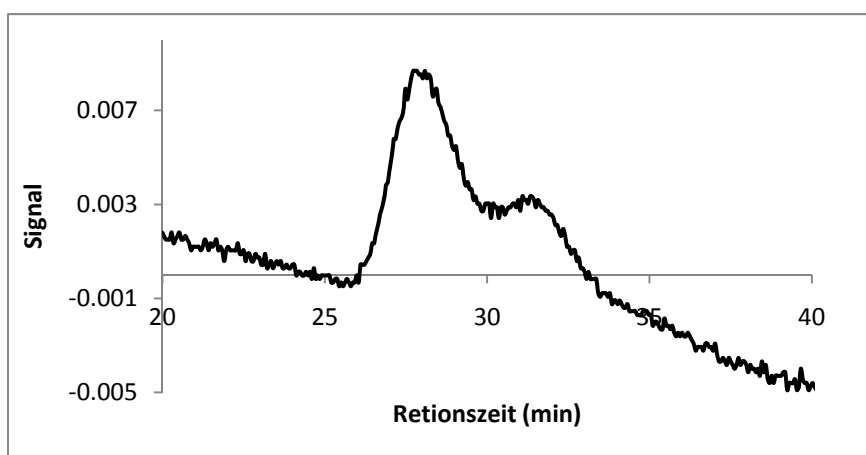


Abb. 36 GPC-Chromatogramm des durch Dialyse gereinigten PEI-SS-PEI der Größe 2.4 MDa und einer Schulter von 50 kDa (PEI:Alkin=1:10, Azid:Alkin=1:1).

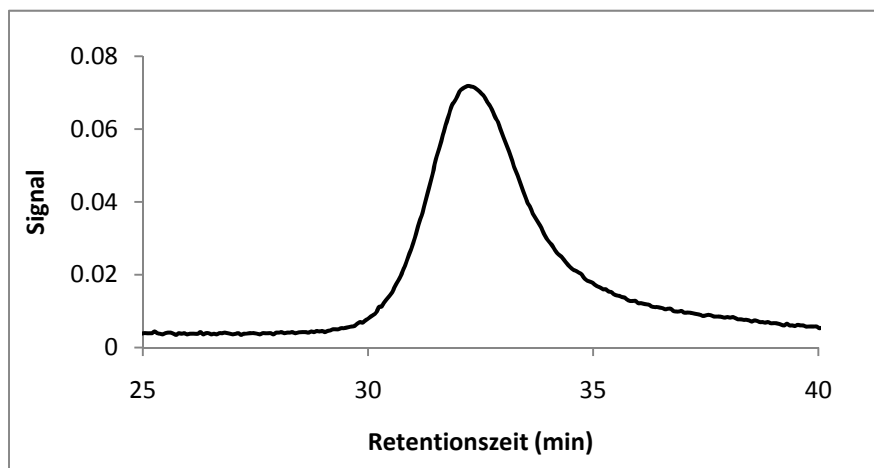


Abb. 37 GPC-Chromatogramm des durch Dialyse gereinigten PEI-SS-PEI der Größe 12 kDa (PEI:Alkin=1:10, Azid:Alkin=1:1).

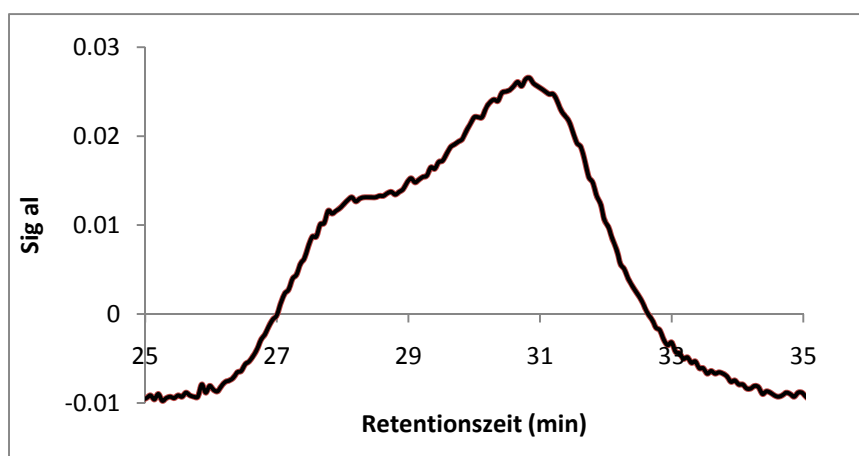


Abb. 38 GPC-Chromatogramm von PEI-SS-PEI mit 670 kDa und 25 kDa (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2).

Aus diesen GPC-Ergebnissen wird deutlich, dass das Ansatzverhältnis zwischen PEI und Alkin ein wichtiger Faktor ist, welcher die Struktur, die Komponenten sowie die entsprechende Größe direkt beeinflussen kann. Ein Trend wurde gezeigt: die Erhöhung des Ansatzverhältnisses zwischen Alkin und PEI erhöht vermutlich die Kupplungsmöglichkeit zwischen unterschiedlichen PEI-Ketten. Erhöht man das Alkin/PEI-Ansatzverhältnis, wird vermutlich ein Produkt mit zunehmendem Molekulargewicht erhalten. Das Verhältnis zwischen Alkin und Azid spielt auch eine Rolle für die Struktur und die Verteilung des Endprodukts. Beim Verhältnis von 1:15 zwischen PEI und Alkin wurde eine Vernetzung von PEI beobachtet, was ein mit GPC

nicht messbares riesiges Polymer hindeutet. Das größte Polymer beim Verhältnis von 1:20 zwischen PEI und Alkin beträgt ca. 650 kDa (siehe Abb. 38), wofür vermutlich das verkleinerte Ansatzverhältnis zwischen Azid und Alkin von 1:2 statt 1:1 verantwortlich ist. Da die an PEI gekoppelte Alkin-Gruppe theoretisch nur zur Hälfte umsetzbar ist, ist die Polymerisation vermutlich ähnlich wie bei 1:10 (PEI:Alkin) mit dem Verhältnis von 1:1 zwischen Azid und Alkin.

3.1.3.1.2 Synthese von PEI-SS-PEI über Click-Chemie mit Linker B

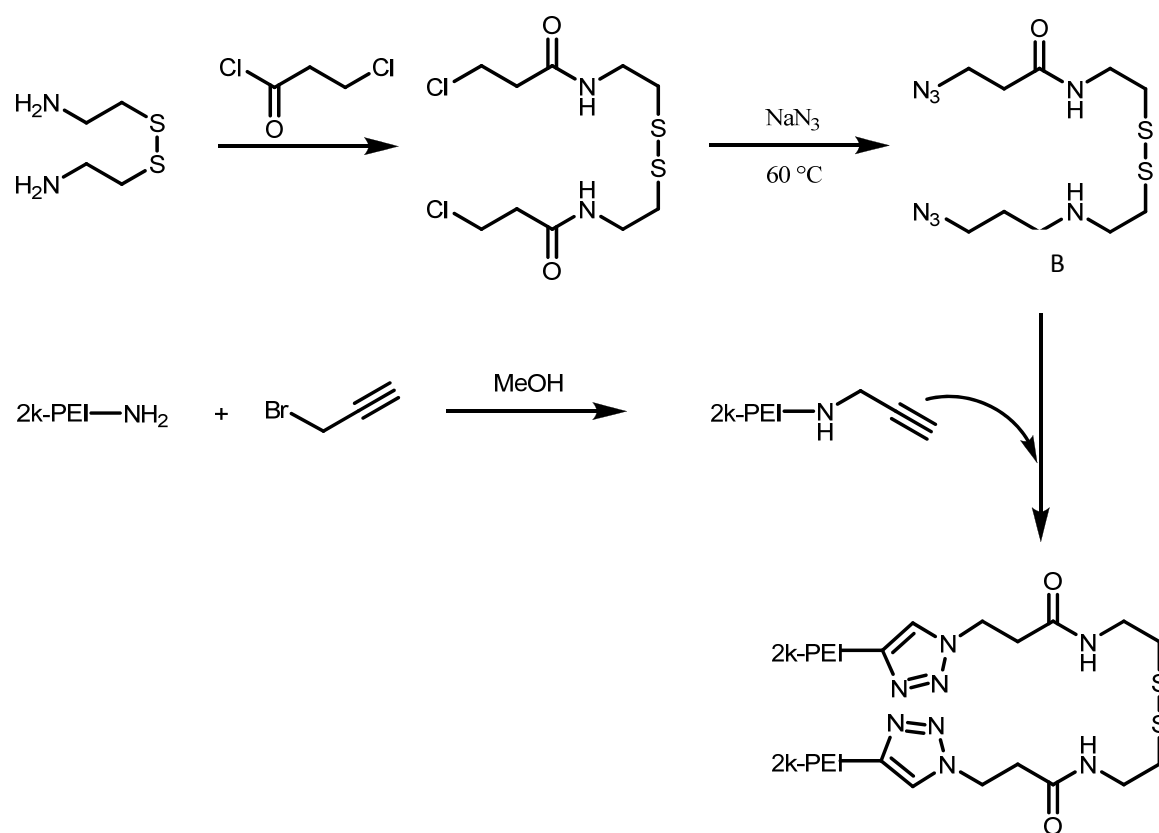


Abb. 39 Synthese von PEI-SS-PEI mit Linker B.

Linker A und Linker B unterscheiden sich durch zwei Kohlenstoffe. Linker B wurde ausgehend von Cystamin mit 3-Chlorpropanoylchlorid statt mit Chloracetylchlorid modifiziert. Die Synthesemethode zur Darstellung des mit Azid funktionalisierten Disulfid-Linkers, die Modifizierung von verzweigtem PEI 2000 mit Alkin sowie die

Kupplung zwischen PEI und Linker über Click-Chemie sind hierbei identisch mit der Methode bei Anwendung des Linkers A. Das molare Verhältnis zwischen PEI und Alkin wurde mit 1:10 und 1:5 eingesetzt. Das molare Verhältnis zwischen Azid und Alkin beträgt 1:1 beim Ansatz.

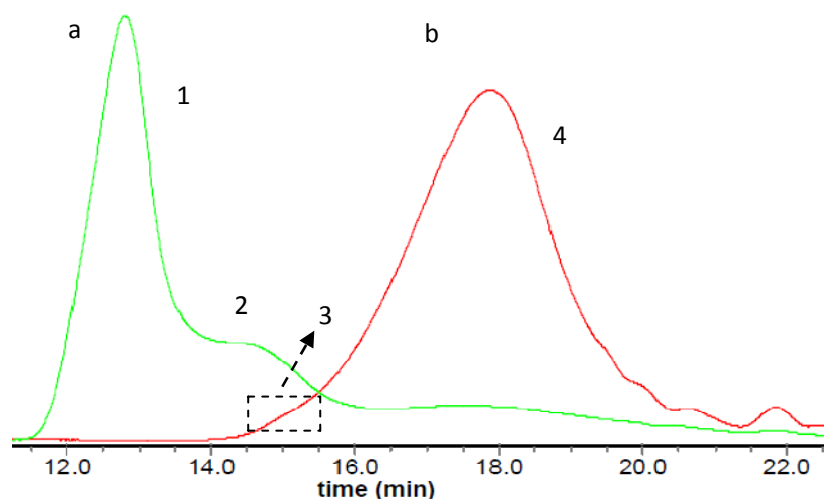


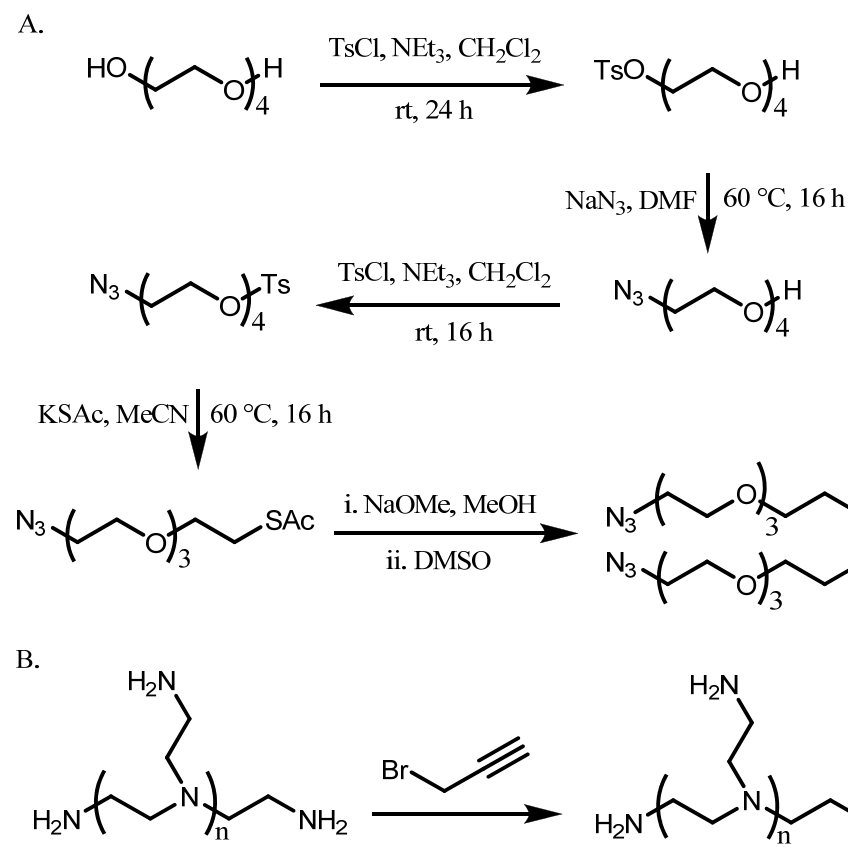
Abb. 40 GPC-Chromatogramm (MALLS, Novema) der mit Linker B dargestellten PEI-SS-PEI nach Dialyse in Wasser mit Membran 1000 Da. a. PEI:Alkin=1:10, $M_{w1}=1.6$ MDa, $M_{w2}=1.2$ MDa, $\overline{M}_{w1,2}=1.5$ MDa (PDI=1.3); b. PEI:Alkin=1:5, $M_{w3}=8$ kDa, $M_{w4}=2$ kDa, $\overline{M}_{w3,4}=2.4$ kDa (PDI=1.5).

Das aus Linker B hergestellte Polymer mit PEI-Alkin-Verhältnis von 1:10 enthält hauptsächlich zwei Komponenten mit den mittels MALLS-Detektor ermittelten Größen von ca. 1.6 MDa ($t_R=11.6-13.6$ min) und 1.2 MDa ($t_R=14.0-15.6$ min). Die durchschnittliche Größe beträgt ca. 1.5 MDa ($t_R=11.6-15.6$ min) (siehe Abb. 40). Beim 1:5 entstand nur ca. 3 % Polymer mit der Größe von 8 kDa ($t_R=14.8-15.7$ min). Unberücksichtigt davon beträgt die Größe des Polymers ca. 2.4 kDa ($t_R=14.8-19.5$ min). Ähnlich wie bei Anwendung des Linkers A ist eine ausreichende Menge von an PEI gekoppelten Alkin für Kupplungsreaktion zwischen den riesigen PEI-Ketten notwendig. Da die Größe der Produkte mit dem MALLS-Detektor und mit Novema-Säulen ermittelt wurde, sind die Ergebnisse der mit Linker A und mit Linker B hergestellten Produkte nicht vergleichbar. Aber mit beiden Linkern wurde das

erwünschte PEI-SS-PEI mit hohem Molekulargewicht bei 1:10 (PEI:Alkin) erfolgreich über Click-Chemie hergestellt.

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment das auf verzweigtem PEI 2000 basierende Copolymer PEI-SS-PEI mit funktionalisiertem Disulfid-Linkers A und B mit Hilfe von Click-Chemie dargestellt. Die Kupplungsmethode mit beiden Linkern ist gleich, während beide Linker sich nur minimal in der Struktur unterscheiden. Die Herstellung des Linkers B bietet die Möglichkeit, die Kettenlänge des Linkers zu steuern. Je länger der Ketten des Linkers, desto höher die Wahrscheinlichkeit der intermolekularen Kupplung mit PEI über Click-Chemie. Außerdem sollte der detaillierte Mechanismus zur Herstellung von PEI-SS-PEI sowie die Kontrolle der Größe des Produkts noch weiter untersucht werden.

3.1.3.2 Synthese von Disulfid-Brücken enthaltendem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit Click-Chemie.



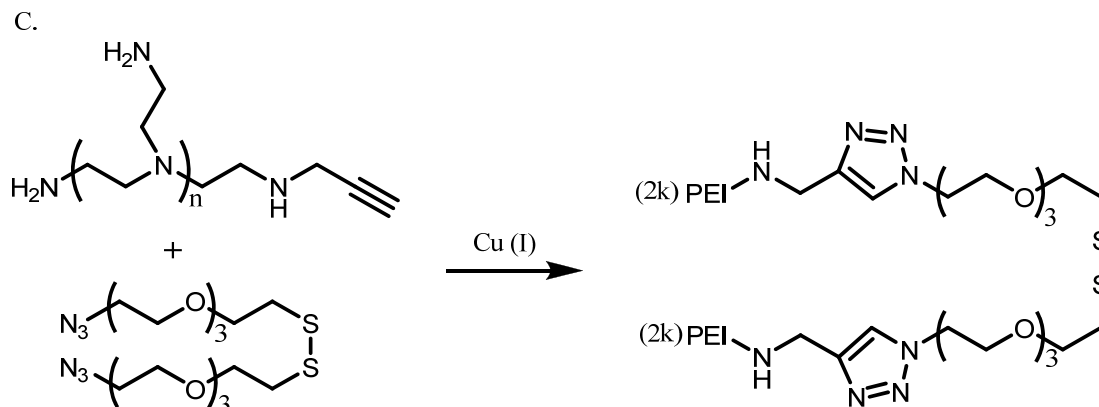


Abb. 41 Synthese des Disulfid enthaltenden PEG-PEI-Copolymers über Click-Chemie: A. Darstellung von Azid funktionalisierten disulfidhaltigem PEG-Linker; B. Synthese von Alkin modifiziertem PEI mit Ansatzverhältnis von 1:10 zwischen PEI und Alkin; C. Blockcopolymerisation von PEI- und PEG-Block über Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition.

Die Synthese von Disulfid enthaltendem PEG-PEI-Copolymer erfolgte in drei Schritten: Darstellung von Azid funktionalisiertem disulfidhaltigem PEG-Linker, Synthese von Alkin modifiziertem PEI mit Ansatzverhältnis von 1:10 zwischen PEI und Alkin und Blockcopolymerisation von PEI- und PEG-Block über Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (siehe Abb. 41). Die Herstellung des mit Azid funktionalisiertem, disulfidhaltigem PEG-Linkers wurde ausgehend von TEG in fünf Reaktionsstufen realisiert [104]. Eine der beiden Hydroxygruppen von TEG wurde zuerst durch eine Tosylgruppe ersetzt, welche als gute Abgangsgruppe fungiert und anschließend mit dem Azid umgesetzt wurde. Die andere Hydroxygruppe wurde dann auch zuerst mit Tosylgruppe modifiziert und danach mit Thioacetat substituiert. Das Thioacetat kann man als eine schützende Thiolgruppe betrachten. Nach Reduktion des Thioacetats mit Natriummethoxid wurde die Thiolgruppe freigesetzt. DMSO wurde dann als Oxidationsmittel zugegeben, wodurch das freie Thiol ein Disulfid bildete. Der daraus entstandene Linker ist daher ein aus zwei TEG-Ketten bestehender, durch Disulfid-Bindung verknüpfter, und mit Azid bifunktionalisierter PEG-Block. Nach

Einführung eines Alkins in verzweigtes PEI 2000 wurde der PEI-Block mit dem PEG-Block in Gegenwart von Cu(I) erfolgreich über Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition copolymerisiert.

Die Copolymerisation wurde auch mit Ansatzverhältnis zwischen Alkin und PEI von 1:5 und 1:7 durchgeführt. Dadurch entstand aber kein hochmolekulares Polymer. Cu(I) als Katalysator der Click-Reaktion wurde *in situ* durch Reduktion von Cu(II) mit Natriumascrobat hergestellt. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung von MeOH und H₂O angewendet. Das Wasser ist nötig zum Lösen des Natriumascrobats. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse in reinstwasser mit einer Membran von 1000 Da und nachfolgender Zentrifugation mit Vivaspin (100,000 Da). Das daraus resultierende Produkt PEI-PEG-SS-PEG-PEI ist völlig wasserlöslich, was geeignet für die Anwendung in der Pharmakotherapie ist. Die chemische Charakterisierung des Produkts erfolgte mittels NMR-, FT-IR-, ESI-MS-Spektrometrie und GPC-Chromatographie.

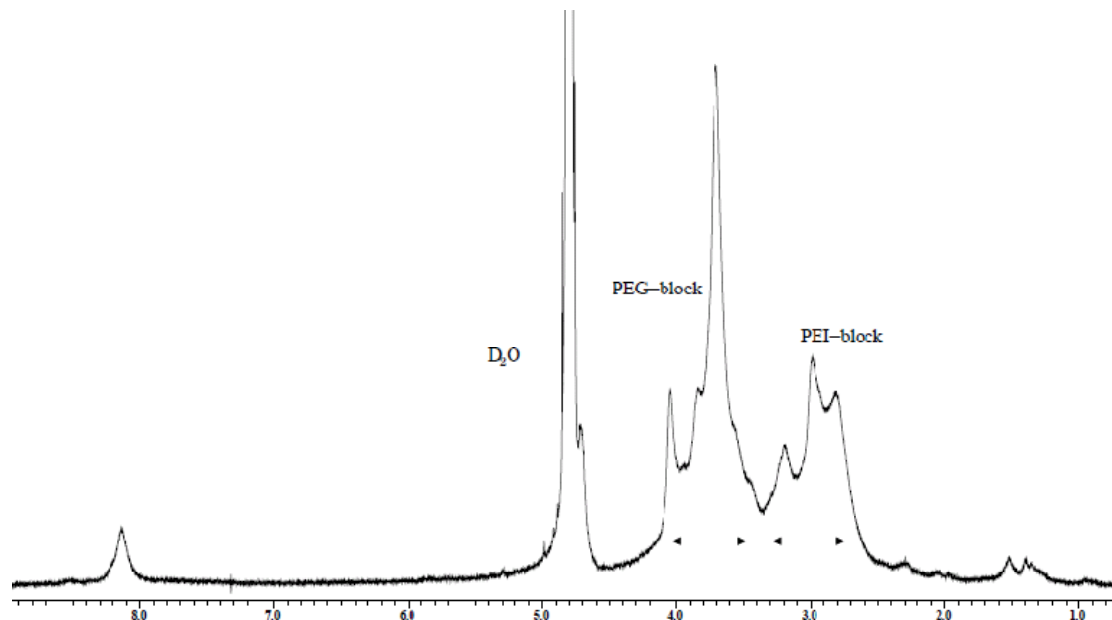


Abb. 42 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O) von PEI-PEG-SS-PEG-PEI.

Im ¹H-NMR-Spektrum werden die zwei Blöcke des Polymers, nämlich der PEG-Block (δ ppm 2.4-3.2) und der PEI-Block (δ ppm 3.3-4.2), sichtbar. Das Signal bei 8.1 ppm gehört zum Triazol-Ring, welcher den Beweis für erfolgreiche Kupplung

zwischen PEG und PEI liefert. Das aus dem NMR-Spektrum berechnete molare Verhältnis zwischen PEI und PEG beträgt etwa 1:8.6. Ca. 86 % des PEG-Blocks wurde an PEI gekoppelt. Da die Signale des PEG-Blocks und des PEI-Blocks überlappen, könnte das entsprechende Integral abweichen.

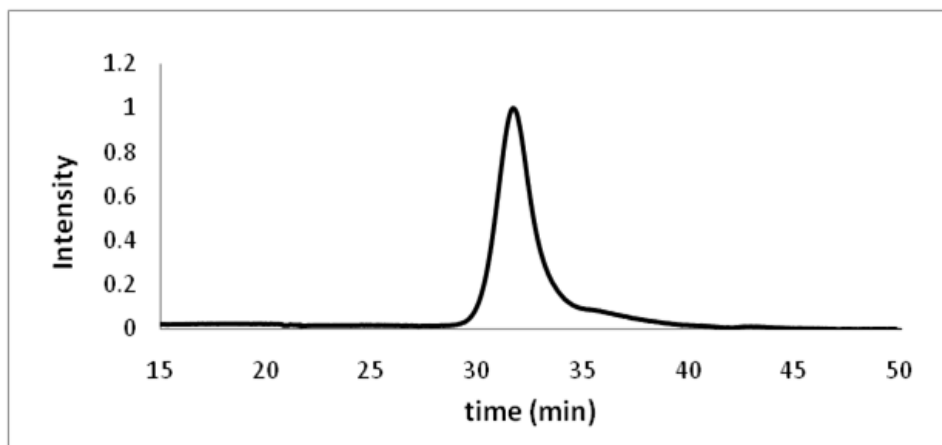


Abb. 43 GPC-Chromatogram des Blockcopolymers PEI-PEG-SS-PEG-PEI nach Reinigung durch Dialyse in Reinstwasser mit Membran von 1000 Da und nachfolgende Zentrifugation mit Vivaspin (100,000 Da).

Das GPC-Chromatogramm (siehe Abb. 43) zeigte ein sauberes Produkt mit enger Verteilung. Die Größe beträgt ca. 22 kDa (PDI=1.7), welche mittels RI-Detektor durch Kalibration der Säulen mit PEI-Standards ermittelt wurde. Die Synthese ist reproduzierbar.

Zusammenfassend wurde das disulfidhaltige PEG-PEI-Copolymer über Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition dargestellt. Wie in der Literatur [74] berichtet bringt die Click-Chemie Vorteile. Sie verläuft unter milden Bedingungen (wie z.B. beim RT). Sie ist gegen Wasser und Luft unempfindlich und die Reaktionszeit ist relativ kurz. Um vollständige Umsetzung zu gewährleisten verlief die Copolymerisation hingegen eine Woche in diesem Experiment. Der Reinigungsprozess des Produkts ist einfach. Im Vergleich zu den bisher vorgestellten Kupplungsmethoden zeigte die Huisgen 1,3-dipolar Cycloaddition sehr hohe Kupplungseffizienz. Die Click-Chemie liefert eine gute Methode zum Blockcopolymerisieren zweier Homopolymeren.

3.2 Beurteilung des Polymers als Carrier für die Gentherapie

3.2.1 Untersuchung der Abbaubarkeit

3.2.1.1 Abbau von PEI-SS-PEI mit DTT

Zur Untersuchung der Abbaubarkeit von mit Disulfid verbundenen Polyethylenimin wurde das Polymer von PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2) verwendet. Die Reduktion des Polymers wurde in PBS-Puffer (pH 7.4) bei 37 °C in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) durchgeführt und mittels GPC detektiert. Es wurde eine schnelle Reduktion des Polymers beobachtet (siehe Abb. 44). Der Peak 2 mit einer relativ kleinen Größe von 25 kDa wurde innerhalb von 5 h schon vollständig in ein Abbauprodukt (Peak 3) umgesetzt. Der Peak 1 mit der Größe von 650 kDa wurde relativ langsam abgebaut, innerhalb von 24 h ist es aber kaum zu beobachten. Das Abbauprodukt (Peak 3) beträgt ca. 2 kDa, welche dem kleinsten PEI-Block entspricht. Dies bedeutet eine völlige Spaltung der Disulfid-Bindungen.

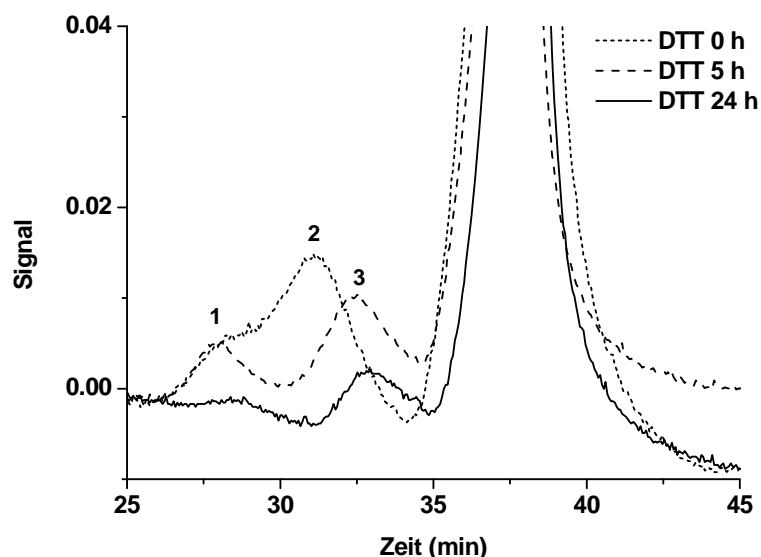


Abb. 44 Abbauuntersuchung von PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2) mit DTT in PBS (pH 7.4) bei 37 °C.

3.2.1.2 Abbau von PEI-PEG-SS-PEG-PEI mit DTT

Die Abbauuntersuchung von über Click-Chemie dargestelltem PEG-PEI-Copolymer (22 kDa) wurde in 5 % Glucose durchgeführt und mittels GPC detektiert (siehe Abb. 45). Da der 1,2,3-Triazolring sehr stabil unter typischen biologischen Bedingungen ist [74], z.B. in reduzierender Umgebung, wird der Abbau nur von Disulfid-Spaltung verursacht. Im GPC-Ergebnis ist es erkennbar, dass die Disulfid-Brücke in Polymerketten in Gegenwart von DTT mit einer Endkonzentration von 100 mM innerhalb von 2 h vollständig abgebaut wurde. Das GPC-Chromatogramm bei 24 h zeigte eine Überlappung mit dem bei 2 h, welches auch einen vollständigen Abbau des PEG-PEI-Copolymer bedeutet. Die Größe des PEG-PEI-Copolymer sank nach dem Abbau von 22 kDa auf 4 kDa. Diese Größe entspricht ungefähr dem kleinsten PEG-PEI-Block (berechnet aus NMR-Spektrum). Wegen der Modifizierung mit einem PEG-Linker ist das Abbauprodukt größer als das Ausgangsmaterial PEI 2000.

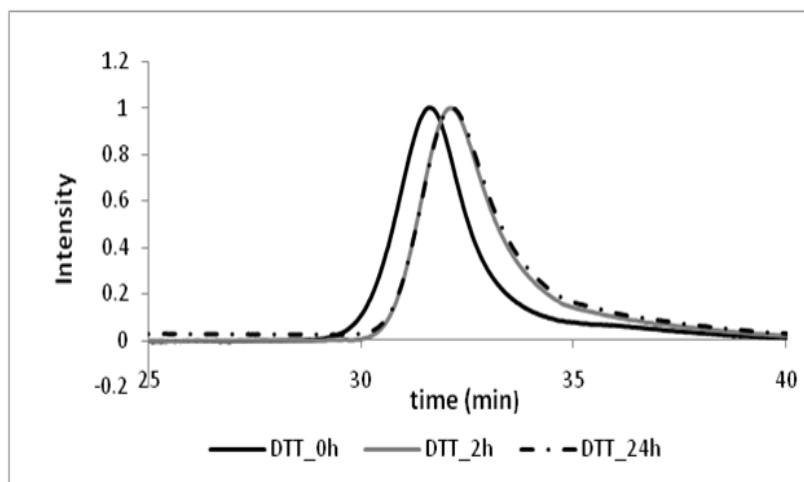


Abb. 45 Abbauuntersuchung von PEI-PEG-SS-PEG-PEI in Gegenwart von DTT (100 mM).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mit Disulfid verknüpfte PEI-Derivaten, sowohl das PEI-SS-PEI als auch das PEI-PEG-SS-PEG-PEI mit Reduktionsreagenz (DTT) innerhalb von 24 Stunden vollständig abgebaut werden

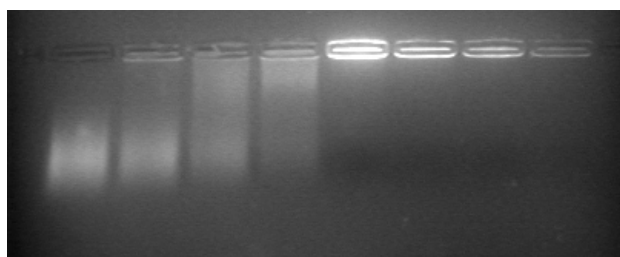
können. Diese schnelle Spaltung der Disulfid-Brücke kann die effiziente Freisetzung von DNA aus Komplexen in reduzierender Umgebung *in vivo* gewährleisten, um den folgende Transport in den Nukleus und die Gentransfektion zu ermöglichen. Die Zytotoxizität dieser bioabbaubaren PEI-Derivaten kann im Vergleich zu PEI 25 kDa reduziert werden, weil die kleinen Abbauprodukte leichter aus der Zelle transportiert werden können.

3.2.2 Komplexierung mit DNA und Charakterisierung über Gelelektrophorese

Die Komplexierung von DNA mit Polykation in kleine Partikel ist eine Voraussetzung für den Transfer der DNA in Zellen. Die Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen zwischen PEI und DNA basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Stickstoff-Atomen des Polymers und den Phosphat-Gruppen der Nucleotide, dem N/P-Verhältnis. Hierbei wurde die Komplexierungsfähigkeit mit HT-DNA von dem über Click-Chemie hergestellten PEG-PEI-Copolymer bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen mittels Agarose-Gel-Elektrophorese untersucht. Außerdem wurden die aus unmodifizierten PEI 2 kDa und PEI 25 kDa hergestellten Polyplexe zum Vergleich untersucht.

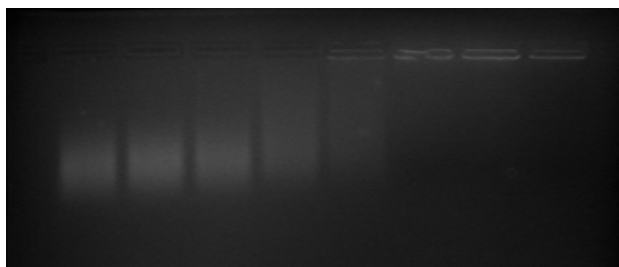
A. PEG-PEI copolymer:

DNA 0.5 1 1.5 2.5 5 7 10



B. PEI 2 kDa:

DNA 0.5 1 2 3 4 5 10



C. PEI 25 kDa:

DNA 0.5 1 2 3 4 5 10

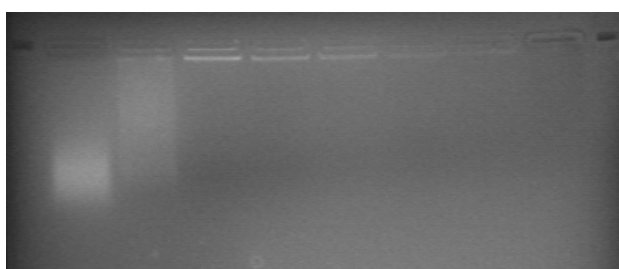


Abb. 46 Agarose Gel Retardation Assay von PEI-PEG-SS-PEG-PEI/HTDNA-Polyplexen (A) und unmodifizierte PEI-Polyplexen (B, C).

Aus dem Agarose Gel Retardation Assay (siehe Abb. 46) ist ersichtlich, dass bei den aus dem PEG-PEI-Copolymer anfertigen Polyplexe eine deutliche Retardation bei N/P 2.5 auftrat, was bedeutet, dass das PEG-PEI-SS-PEI-PEG ab N/P 2.5 DNA kondensieren kann. Eine dichte Komplexierung mit DNA trat bei N/P 10 auf, die retardierten Polyplexe zeigten kaum Fluroeszenz durch Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid. Bei den aus PEI 2 kDa angefertigen Polyplexen zeigte sich die Komplexierung mit DNA bei ca. N/P 4, während die aus PEI 25 kDa angefertigen Polyplexen die beste Kondensationsfähigkeit bei ca. N/P 1 aufwies. Die Fähigkeit zum Komplexieren mit DNA von PEG-PEI-Copolymer ist schwächer im Vergleich zu der von PEI 25 kDa, was vermutlich von der Abschirmung des PEG-Blocks verursacht wird. PEI 2 kDa hat die niedrigste Kondensationsfähigkeit, da es das kleinste Molekulargewicht somit die kürzeste Polymerketten, welche ineffizient die DNA überdecken können, besitzt.

3.2.3 Größe und Zeta-Potential der Polyplexe

Wie in der Literatur berichtet wurde [105, 106], sind die Größe, nämlich der hydrodynamische Durchmesser, und das Zetapotenzial (ζ -Potential) der Polyplexe sind wichtige Faktoren zur Förderung von Gentransfer in Zellen. Hierbei wurde das über Click-Chemie hergestellte PEI-PEG-SS-PEG-PEI zur Untersuchung der Größe und des Zetapotenzials von der daraus hergestellten Polymer/DNA-Polyplexe angewendet.

Größe:

Die Größe der aus PEG-PEI-Copolymer und aus reinem PEI (2 kDa, 25 kDa) anfertigen Polyplexe bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen ist in Abb. 47 schematisch dargestellt. Die Größe aller Polyplexen liegt im Bereich von 80-130 nm in 5 % Glukose bei pH 7.4, was eine gute Komplexierungsfähigkeit des PEG-PEI-Copolymers mit DNA bedeutet. Bei niedrigen N/P-Verhältnissen, wie z.B. bei N/P 2.5 und N/P 5, zeigte das PEG-PEI-Copolymer eine kleinere Partikelgröße als PEI 25 kDa, aber bei höheren N/P-Verhältnissen größere. Es ist möglich, dass die PEG-Ketten bei höheren N/P-Verhältnissen eine effizientere Abschirmung an der Oberfläche der Polyplexe bewirken. Der PEG-Abstandsblock beeinflusste die Kondensationsfähigkeit, somit erhöhte sich die Polyplexgröße. Im Allgemeinen können PEG-PEI-Copolymers gut mit DNA komplexieren und stabile kleine Partikel bilden, was mit den Ergebnissen von PEI-PEG-SS-PEG-PEI übereinstimmt. Keine Aggregation wurde bei vermessenen N/P-Verhältnisse beobachtet.

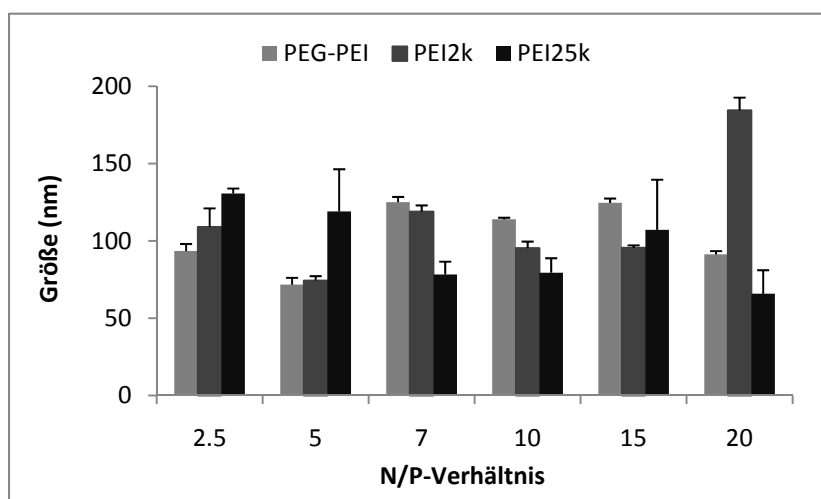


Abb. 47 Hydrodynamische Durchmesser der PEI-PEG-SS-PEG-PEI/DNA-Polyplexe und der PEI/DNA-Polyplexe in 5 % Glukose-Lösung bei pH 7.4.

Zetapotential:

Die Oberflächenladung der Polyplexe kann durch Bestimmung des Zeta-Potentials mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie untersucht werden. Es wurde berichtet [107], dass reine DNA ein hohes negatives Zetapotential von -33mV besitzt, während die Polyplexe in der Regel positive Zetapotentiale wegen überschüssigen Polykations aufwiesen. Die vermessenen Werte der Zetapotentiale von aus PEI-PEG-SS-PEG-PEI und reinem PEI angefertigten Polyplexe werden in Tabelle 6 angegeben. Die PEG-PEI-Polyplexe zeigten positive Zetapotentiale im Bereich von 10-30 (± 3) mV zwischen N/P 2.5 und N/P 20, welche durchschnittlich niedriger als die Werte von PEI25k/DNA-Polyplexe im Bereich von 30-50 (± 1) mV sind. Dies wird vermutlich von der Oberflächeabschirmung des PEG-Blocks verursacht. Darum wird angenommen, dass der PEG-Block, welche die positive Flächenladung der Polyplexe reduziert, teilweise an der Partikeloberfläche auftauchen kann.

Tabelle 6. Zetapotential von PEG-PEI/DNA-Polyplexe und PEI/DNA-Polyplexe.

PEG-PEI	N/P	1	2.5	5	7	10	15	20
	Mean	-12.5	19.1	33.7	24.8	25.9	22.7	17.2
	Std Dev	5.7	0.8	1.3	3.0	0.6	1.3	3.2
PEI2k	N/P	2.5	7	10	15	20		
	Mean	14.7	16.1	30.1	29.8	32.9		
	Std Dev	1.3	5.2	6.4	6.2	5.7		
PEI25k	N/P	0.5	1	2	4	7		
	Mean	-14.8	-14.5	31.1	44.0	49.9		
	Std Dev	1.4	1.3	0.9	1.0	1.4		

3.2.4 Untersuchung der Morphologie über AFM

In den letzten Jahren wurde AFM (Atomic Force Microscope) als eine angemessene Methode zur Untersuchung der Morphologie und Größe von Polymer/DNA-Polyplexe betrachtet [92]. Zur Bildung von Polyplexen wurden das PEI-PEG-SS-PEG-PEI und Plasmid DNA angewendet. Aufgenommen sind die Proben der frisch hergestellten Polyplexe bei N/P 7 mit einer Scangröße von $2 \times 2 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 48). Die Abbildung zeigt, dass die plasmid DNA mit dem PEG-PEI-Copolymer hoch kondensierte und kugelförmige Partikel mit Größen von etwa 50-100 nm bildete, während plasmid DNA allein eine Struktur von gelockerten offenen Schleifen mit kleiner Drehung auftrat [92]. Im Vergleich zu der Messwerte über PCS sind die über AFM ermittelten Werte kleiner. Die unterschiedliche Art von DNA könnte eine mögliche Erklärung dafür zu liefern. Bei AFM-Aufnahmen wurde die Plasmid DNA verwendet. Im Unterschied zu Herring Testes DNA, welche aus DNA mit kontinuierlichem Größenband besteht und bei PCS verwendet wurde, besitzt die Plasmid DNA eine bestimmte und kleine Größe. Daher ist es möglich, dass das Polymer plasmid DNA besser als HT-DNA kondensieren kann. Daher wurde homogene kleinere Partikelgröße bei der AFM-Untersuchung beobachtet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus PCS wurde kein Aggregat der Polyplexe in AFM-Bild beobachtet, was bedeutet, dass die aus PEI-PEG-SS-PEG-PEI angefertigten Polyplexe stabil sind.

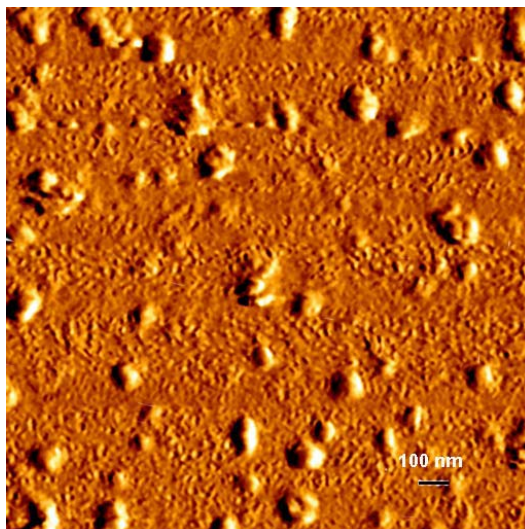


Abb. 48 AFM-Bild von PEI-PEG-SS-PEG-PEI/pDNA-Polyplexe bei N/P 7 in 5 % Glukose bei pH 7.4. Die Skala (schwarze Linie) entsprechend 100 nm.

3.2.5 Zytotoxizität

Alle Daten bezüglich der Zytotoxizität und der Transfektion der in dieser Arbeit synthetisierten Polymere wurden von S. Rösler gesammelt. Die metabolische Aktivität von mit Polymer behandelten Zellen L929 wurde mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Assays [108] untersucht. Die Zytotoxizität des PEG-PEI-Copolymers (PEI-PEG-SS-PEG-PEI) wurde mit der Toxizität von reinem PEI 2 kDa und PEI 25 kDa verglichen. Wie es in Abb. 49 angegeben ist, beträgt der IC_{50} -Wert von PEI 25 kDa ca. 10 $\mu\text{g/mL}$. Dieser Wert stimmt mit dem von der Literatur berichteten Wert [97] überein. Das PEI 2 kDa zeigte einen IC_{50} -Wert von etwa 487 $\mu\text{g/mL}$, während der IC_{50} -Wert von dem PEG-PEI-Copolymer 227 $\mu\text{g/mL}$ betrug. Im Vergleich zu PEI-Standards ist das PEG-PEI-Copolymer ca. 22 fach ungiftiger als PEI 25 kDa und ungefähr nur 2 fach toxischer als das untoxische PEI 2 kDa. Aus den Ergebnissen ist zu vermuten, dass die Modifizierung von PEI mit PEG ausreichende Abschirmung liefert, und der schnelle Abbau auch eine Rolle für das Sinken der Toxizität spielen kann.

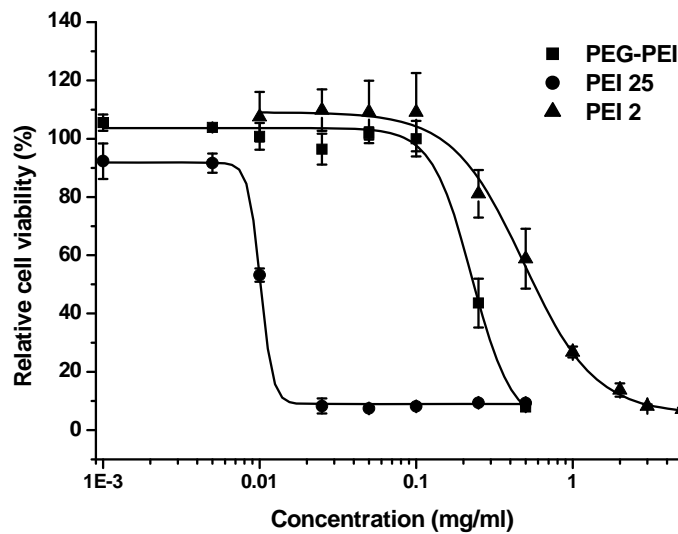


Abb. 49 Vergleich der Cytotoxizität von PEI-PEG-SS-PEG-PEI mit PEI 25 kDa und PEI 2 kDa durch Ermittlung der entsprechenden IC_{50} -Werte mit Hilfe von MTT-Assay.

3.2.6 Transfektion

Die Transfektionsversuchen wurden in L929 Fibroblast mit Luciferase-kodierender Plasmid DNA (pCMV-luc) bei unterschiedlichen N/P-Verhältnissen im Bereich von 10-80 durchgeführt. Hierbei wurde die Transfektionseffizienz von aus Linker B hergestelltem PEI-SS-PEI mit oder ohne zusätzliche Zugabe von GSH (5 mM) sowie die Transfektionseffizienz von über Click-Chemie hergestelltem PEG-PEI-Copolymer (PEG-PEI-SS-PEI-PEG) im Vergleich zu der von PEI 2 kDa und PEI 25 kDa untersucht.

Die Anwendung von GSH liegt daran, dass L929-Zellen eine niedrige GSH-Konzentration besitzen [109]. Durch zusätzliche Zugabe von GSH kann der Einfluss ihrer Konzentration an die Transfektionseffizienz des disulfidhaltigen Polymers untersucht werden. Das Glutathion führt zu einem Abbau des Polymers im Cytosol durch Spaltung der Disulfid-Brücken. Aufgrund dieser Spaltung ist die Effektivität des Gentransfers herabgesetzt, da die Bindung der DNA im Polyplex mit

einem Polymer höheren Molekulargewichts stattgefunden hat. Das resultierende PEI 2 kDa sollte eine geringere Transfektionseffizienz zeigen als das hochmolekulare Kupplungsprodukt. Vergleichend wurden daher Polyplexe der gleichen Charge mit und ohne Glutathionspiegelerhöhung getestet.

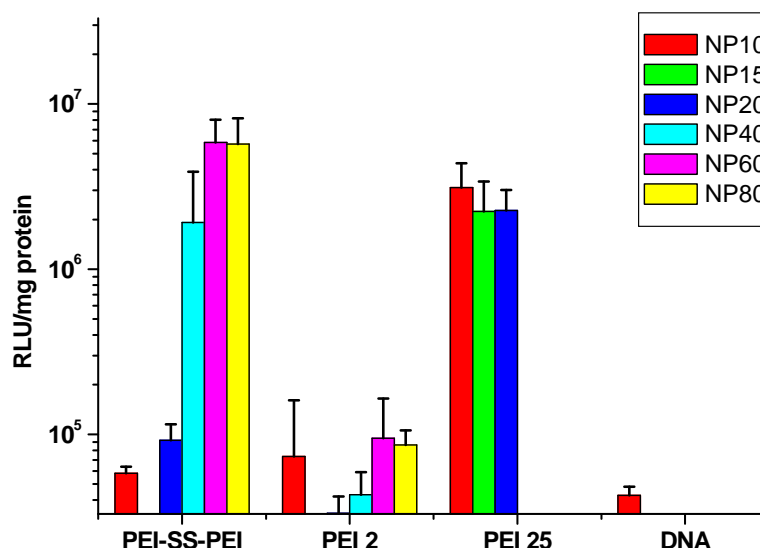


Abb. 50 Transfektionseffizienz von PEI-SS-PEI im Vergleich zu der von PEI 2 kDa und PEI 25 kDa in L929 Fibroblast mit Luciferase kodierender Plasmid DNA bei unterschiedlicher N/P-Verhältnisse im Bereich von 10-80 ohne zusätzliche Zugabe von GSH.

Aus Abb. 50 und Abb. 51 ist es erkannt, dass die Zellen bessere Transfektionseffizienz bei erhöhendem N/P-Verhältnis zeigten, da die Stabilität der DNA in der Polyplexe durch zunehmende Polymermenge erhöht wurde. Bei optimalem N/P-Verhältnis erzielte das PEI-SS-PEI ca. 1.9 fach der Transfektionseffizienz von PEI 25 kDa ohne Zugabe von GSH und etwa 20 % davon mit Zugabe von GSH. Es wird vermutet, dass die Disulfidbrücke in Gegenwart von GSH mit erhöhter Konzentration im Cytosol schneller abgespalten ist, daher wurde die Effektivität des Gentransfers somit die Transfektionseffizienz erniedrigt. Dieses Ergebnis lieferte noch einen indirekten Beweis dafür, dass das disulfidhaltige PEI-SS-PEI *in vitro* abbaubar ist.

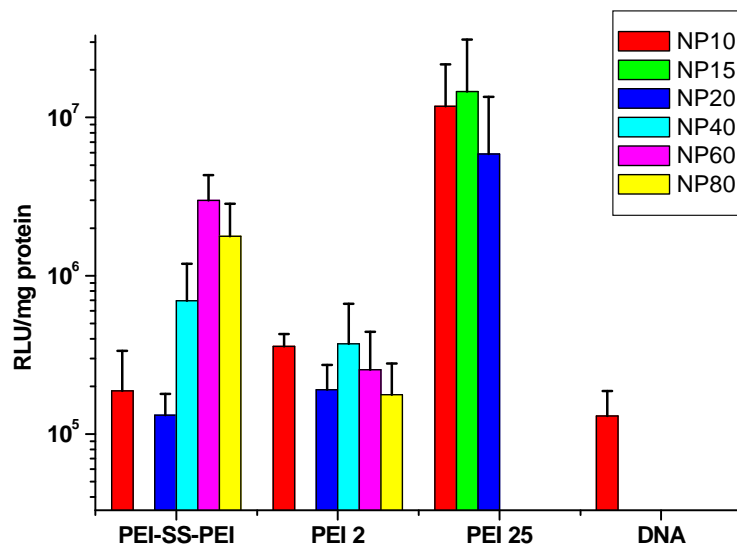


Abb. 51 Transfektionseffizienz von PEI-SS-PEI im Vergleich zu der von PEI 2 kDa und PEI 25 kDa in L929 Fibroblast mit Luciferase kodierender Plasmid DNA bei unterschiedlicher N/P-Verhältnisse im Bereich von 10-80 mit zusätzliche Zugabe von GSH (5 mM).

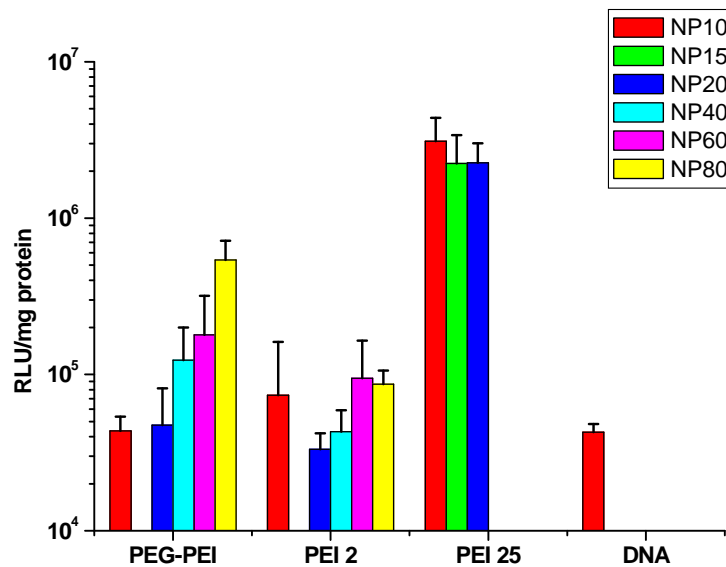


Abb. 52 Transfektionseffizienz von PEI-PEG-SS-PEG-PEI im Vergleich zu der von PEI 2 kDa und PEI 25 kDa in L929 Fibroblast mit Luciferase kodierender Plasmid DNA bei unterschiedlicher N/P-Verhältnisse zwischen 10 und 80 ohne zusätzliche Zugabe von GSH.

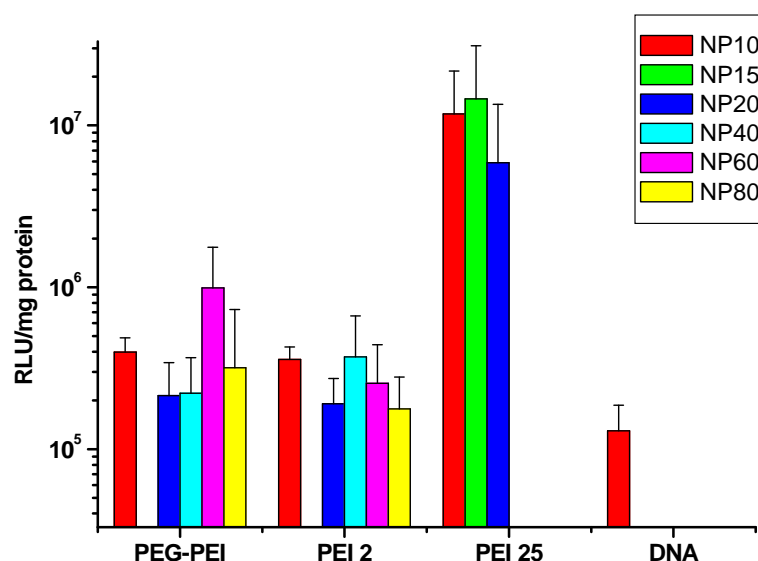


Abb. 53 Transfektionseffizienz von PEI-PEG-SS-PEG-PEI im Vergleich zu der von PEI 2 kDa und PEI 25 kDa in L929 Fibroblast mit Luciferase kodierender Plasmid DNA bei unterschiedlicher N/P-Verhältnisse zwischen 10 und 80 mit zusätzliche Zugabe von GSH.

Aus Abb. 52 ist es erkennbar, dass PEI 2 kDa eine niedrige Transfektionseffizienz auf dem Niveau von freier DNA und geringe Zunahme bei hoher N/P-Verhältnisse zeigte. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein [110] und kann von erniedrigtem Schutz für DNA mit niedermolekularem PEI geklärt werden. Nach Kupplung von dem kurzkettigen PEG und Verknüpfung mit Disulfid-Brücke wurde eine annähernd 6 fache Zunahme der Transfektionseffizienz bei optimalem N/P-Verhältnis erhalten. Das molekulare Gewicht von PEI-PEG-SS-PEG-PEI ist hierbei ähnlich wie das von PEI 25 kDa. Bei optimalem N/P-Verhältnis erzielte das PEI-PEG-SS-PEG-PEI etwa 17 % der Transfektionseffizienz von PEI 25 kDa ohne Zugabe von GSH. Dies ist ca. 2.5 fach höher als seine Transfektionseffizienz mit Zugabe von GSH (siehe Abb. 53). Der durch GSH beschleunigte Abbau des Copolymers ist vermutlich dafür verantwortlich. Mit erhöhendem N/P-Verhältnis zeigten die Zellen bessere Transfektion, was durch erhöhte Stabilität von DNA in der Polyplexe somit verbesserten Schutz für DNA erklärt werden kann. Wegen der Abschirmungswirkung

von PEG-Block wurde es oft berichtet, dass die Transfektionseffizienz von PEGyliertem PEI niedriger als die von reinem PEI mit der gleichen Größe ist, allerdings ist die Cytotoxizität viel niedriger und die Zeit im Kreislauf *in vivo* kann sich verlängern [111]. Durch Anwendung eines mit disulfidhaltigem PEG gekoppelten niedermolekularen PEI wurden einige Vorteile eingebracht: 1) die Transfektionseffizienz von niedermolekularem PEI kann erhöht werden, 2) PEG führt zu einer Abschirmungswirkung von der hohen positiven Ladung, erhöht somit die Stabilität der Polyplexe und beschränkt die toxische Nebenwirkung, 3) das niedermolekulare PEI weist eine geringere Toxizität als das hochmolekulare PEI auf, und 4) Disulfid-Brücke führt zu Abbau des Carriers, dadurch setzt das PEG-PEI-Copolymer in niedermolekularem Abbauprodukt um, welches ohne Akkumulation leichter aus der Zellen transportiert wird. Im Vergleich zu PEI-PEG-SS-PEG-PEI zeigte das PEI-SS-PEI ohne Kupplung des PEG-Blocks ca. 10 fach der Transfektion von PEG-PEI-Copolymer, was auch durch Abschirmungswirkung von PEG-Block geklärt werden kann.

4. Experimenteller Teil

4.1 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit SMPT

4.1.1 Darstellung von TsO-PEG-OTs

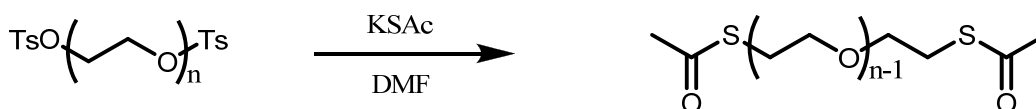


PEG 1000 Da (2.00 g, 2.0 mmol, 1.0 eq) wurde in 100 mL CH_2Cl_2 gelöst. DMAP (0.012 g, 0.1 mmol, 5 % eq) und NEt_3 (980 μL , 3.5 eq) wurden zu der PEG-Lösung zugegeben. Bei 0 °C wurde TsCl (0.96 g, 5.0 mmol, 2.5 eq) langsam zu der Reaktionsmischung zugegeben. Nach Lösen von TsCl wurde das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für weitere 48 h gerührt. Danach wurde gesättigte NaHCO_3 -Lösung zum Extrahieren zugegeben. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach chromatographischer Reinigung mit MTBE/PE (1:1, $R_f = 0.55$) wurde ein öliges Produkt mit leicht gelber Farbe erhalten. Außerdem konnte das Produkt (2.2 g, 84 %) auch durch Umfällung mit n-Hexan in THF aufgereinigt werden.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.42 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 3.50-3.80 (m, 106H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$); 4.13 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{OTs}$); 7.32 (d, 4H, $-\text{CHAr}-$); 7.77 (d, 2H, $-\text{CHAr}-$, $J = 8.0$ Hz).

^{13}C -NMR (100.53 MHz, CDCl_3) δ ppm: 21.7 ($-\text{Ar}-\text{CH}_3$); 68.7-70.7 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ und $-\text{CH}_2-\text{OTs}$); 128.0, 129.9 ($-\text{CHAr}-$); 133.0 ($-\text{CAr}-\text{SO}_2-$); 144.9 ($-\text{CAr}-\text{CH}_3$).

4.1.2 Darstellung von AcS-PEG-SAc

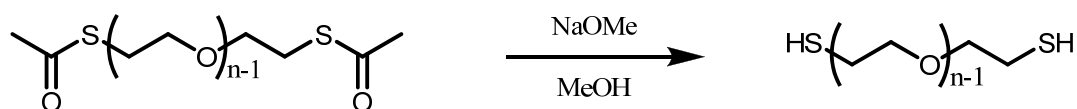


Zu einer Lösung von TsO-PEG-OTs (1.79 g, 1.38 mmol, 1.0 eq) in 30 mL DMF wurde Kaliumthiolacetat (0.76 g, 6.65 mmol, 4.8 eq) in 30 mL DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT 48 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum kondensiert und entfernt. Dann wurde 100 mL Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde mit CHCl_3 viermal extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Die Reinigung des öligen Produkts (1.26 g, 82 %) erfolgte durch Umfällung in Aceton mit n-Hexan als Fällungsmittel.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.24 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 2.99 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-$, $J = 6.5$ Hz); 3.50 (t, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-$, $J = 6.5$ Hz); 3.52-3.62 (m, 104H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.77 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.7 ($-\text{CO}-\text{CH}_3$); 30.4 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); 69.6-70.5 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ und $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-$); 195.2 ($-\text{CO}-\text{S}-$).

4.1.3 Darstellung von HS-PEG-SH

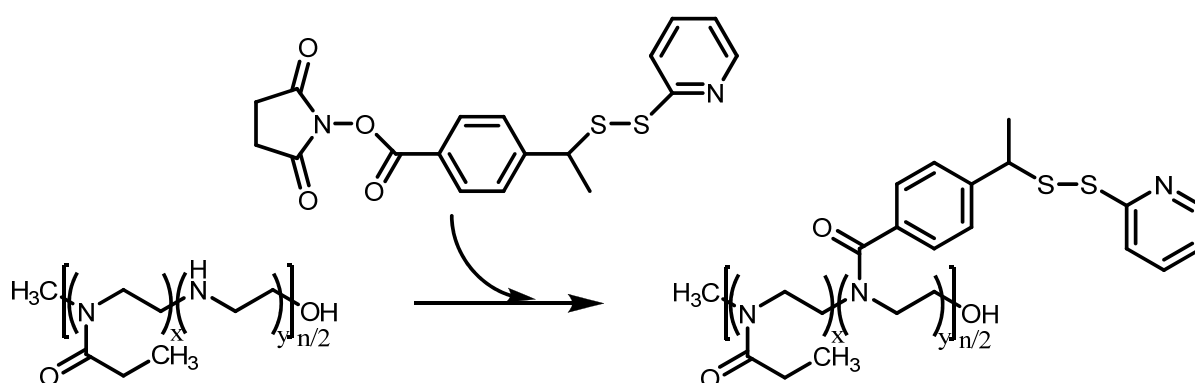


AcS-PEG-SAc (0.54 g, 4.8 mmol, 1.0 eq) wurde in 10 mL MeOH gelöst. Unter Schutzgas wurde 300 μL NaOMe (30 wt% in MeOH) in 10 mL MeOH gelöst und dann zu der Reaktionslösung zugegeben. Das Gemisch wurde bei RT 24 h gerührt. Danach wurde Essigsäure (5 % v/v in Ether) zugetropft, bis der pH-Wert der Reaktionslösung auf 5 bis 6 eingestellt war. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde MeOH zugegeben. Der unlösliche Feststoff wurde abfiltriert. Ein öliges Rohprodukt (0.23 g, 43 %) wurde nach Entfernung von MeOH erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm: 2.67 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-SH}$, $J = 6.4$ Hz); 3.54-3.73 (m, 126H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$).

^{13}C -NMR (100.53 MHz, CDCl_3) δ ppm: 24.6 ($-\text{CH}_2\text{-SH}$); 70.4-71.3 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 74.1 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH-}$).

4.1.4 Modifizierung von linearem PEI 2500 mit SMPT



Methode A:

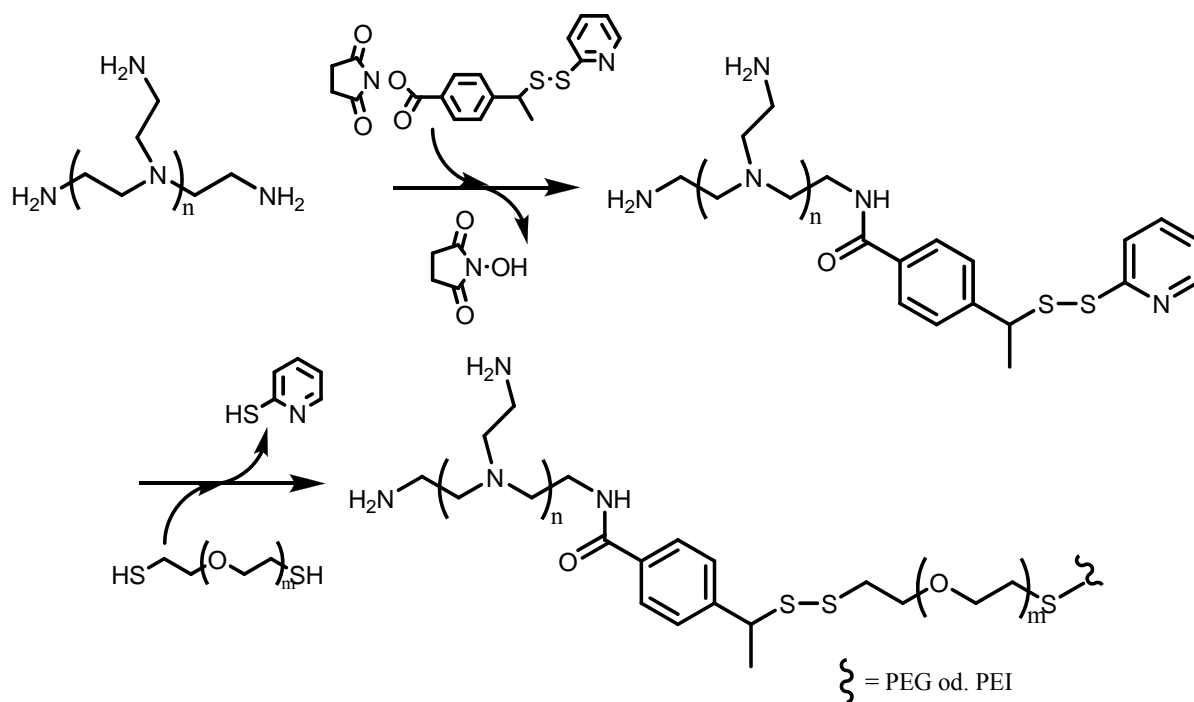
Das SMPT (10.08 mg, 25.9 mmol, 4.2 eq) wurde zuerst in 3 mL DMSO gelöst und dann bei RT zu linearem PEI 2500 (15.26 mg, 6.1 mmol, 1.0 eq) in 15 mL PBS-Lösung (pH 7.4) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 24 h gerührt. Ein hellgelbes öliges Rohprodukt wurde durch Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer 1000 Da Membran erhalten.

Methode B:

Bei RT wurde lineares PEI 2500 (9.63 mg, 3.8 mmol, 1.0 eq) in 0.5 mL Ethanol gelöst. Dann wurde SMPT (5.30 mg, 13.6 mmol, 3.5 eq) in 0.5 mL Ethanol zu der PEI-Lösung zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde bei RT 24 h gerührt. Ein hellgelbes öliges Rohprodukt wurde durch Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer 1000 Da Membran erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm: 1.1 (t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); 1.7 (d, $\text{CH}_3\text{-CH-}$); 2.3-3.9 (m, $\text{-CH}_2\text{-}$); 4.0 (-CH-ph-); 7.1-7.6, 8.2 (m, CHAr).

4.1.5 Copolymerisation von PEG-PEI durch Kupplung mit SMPT



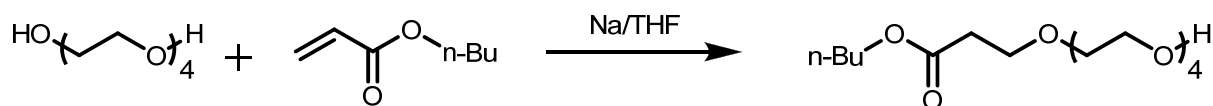
Das verzweigte PEI 2000 (6.6 mg, 3.3 μmol , 1.0 eq) wurde in 0.5 mL MeOH gelöst. Das SMPT (12.5 mg, 32.2 μmol , 9.8 eq) wurde in 0.5 mL DMSO gelöst und dann zu der PEI-Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 2 h gerührt. Danach wurde HS-PEG-SH (49 mg, 49 μmol , 14.8 eq) in 0.5 mL MeCN zu der Reaktionsmischung gegeben. Diese Lösung wurde für weitere 24 h gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer 1000 Da Membran.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm: 2.4-3.0 (m, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$); 2.9 (t, $\text{-CH}_2\text{-S-S-}$); 3.3-3.9 (m, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 7.2, 7.7 (CHAr).

4.2 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mit

SAT(PEO)₄

4.2.1 Darstellung von HO(PEO)₅COOnBu



TEG (50 mL, 0.288 mol, 1.0 eq) wurde in 150 mL trockenem THF gelöst. Bei RT wurde Natrium (80 mg, 3.48 mmol, 1.2 % eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 40 °C erwärmt, bis das Natrium vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf RT wurde n-Butylacrylat (14 mL, 0.098 mol, 0.34 eq) langsam zugetropft und weitere 18 h gerührt. Nach der chromatographischen Aufreinigung mit CH₂Cl₂/MeOH (95:5) erhielt man ein aus zwei Isomeren bestehendes farbloses öliges Rohprodukt (19.7 g, 87 % nach n-Butylacrylat).

HO(PEO)₅COOnBu (HP, 62 % des Gesamtprodukts):

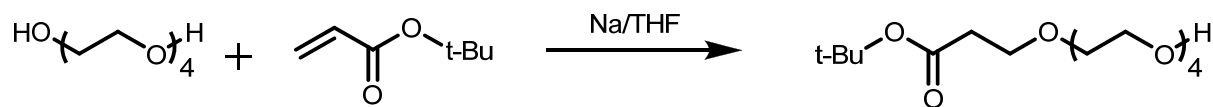
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.41 (t, 3H, -CH₃); 1.38 (m, 2H, -CH₂-CH₃); 1.60 (tt, 2H, -CH₂-CH₂-CH₃); 2.58 (t, 2H, -CH₂-CO-); 3.55-3.75 (m, 18H, -CH₂-O-); 4.08 (t, 2H, -CH₂-O-CO-).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.8 (-CH₃); 19.2 (-CH₂-CH₃); 30.8 (-CH₂-CH₂-CH₃); 35.2 (-CH₂-CO-); 61.9 (-CH₂-OH); 63.8 (-CH₂-O-CO-); 69.3, 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, 72.7, 77.2 (-CH₂-O-); 171.8 (-CO-).

HO(PEO)₄OCOCH=CH₂ (NP, 38 % des Gesamtprodukts):

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.55-3.75 (m, 14H, -CH₂-O-); 4.32 (t, 2H, -CH₂-O-CO-); 5.83 (dd, 1H, CH₂=CH-); 6.15 (dd, 1H, -CH-); 6.42 (dd, 1H, CH₂=CH-).

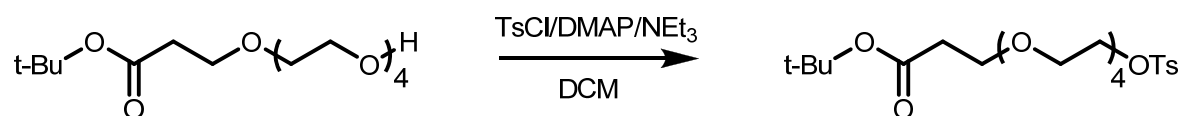
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 61.9 (-CH₂-OH); 64.5 (-CH₂-O-CO-); 69.3, 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, (-CH₂-O-); 128.4 (-CH-); 131.1 (CH₂=CH-); 166.3 (-CO-).

4.2.2 Darstellung von HO(PEO)₅COOtBu

TEG (40 g, 0.21 mol, 1.0 eq) wurde im Vakuum 1 h getrocknet und in 80 mL trockenem THF gelöst. Nach der Zugabe von Natrium (60 mg, 2.6 mmol, 1.2 % eq) wurde das Reaktionsgemisch auf 40 °C erwärmt, bis das Natrium vollständig gelöst war. Danach wurde tert-Butylacrylat (14.2 mL, 0.10 mol, 0.48 eq) zugegeben und die Reaktionslösung wurde bei 50 °C weitere 48 h gerührt. Nach chromatographischer Aufreinigung mit CH₂Cl₂/MeOH (95:5, R_f=0.67) wurde ein farbloses öliges Produkt (12.65 g, 39 %) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃); 2.47 (s, 2H, -CH₂-CO-); 2.71 (s, 1H, -OH); 3.55-3.75 (m, 18H, -CH₂-O-).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 28.2 (-C(CH₃)₃); 36.4 (-CH₂-CO-); 61.8 (-CH₂-OH); 67.0, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, 72.6, 77.2 (-CH₂-O-); 80.6 (-C(CH₃)₃); 171.0 (-CO-).

4.2.3 Darstellung von TsO(PEO)₅COOtBu

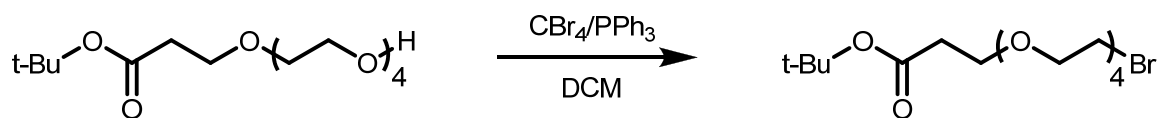
HO(PEO)₅COOtBu (4.07 g, 12.6 mmol, 1.0 eq) wurde in 50 mL CH₂Cl₂ gelöst. Dazu wurden DMAP (76.6 mg, 0.63 mmol, 5 % eq) und NEt₃ (6 mL, 42.9 mmol, 3.5 eq) zugegeben. TsCl (5.91 g, 31.0 mmol, 2.5 eq) wurde in 50 mL CH₂Cl₂ gelöst und bei 0 °C zu der Reaktionslösung langsam zugetropft. Nach Lösen von TsCl wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und für weitere 24 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄

getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Durch chromatographische Reinigung mit Pentan/MTBE (1:1) wurde ein farbloses öliges Produkt (4.36 g, 73 %) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.42 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.43 (s, 3H, $-\text{phCH}_3$); 2.48 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 3.54-3.72 (m, 16H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 4.14 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-OTs}$); 7.32 (d, 2H, $-\text{CHAr-}$); 7.72 (d, 2H, $-\text{CHAr-}$).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 21.7 ($-\text{phCH}_3$); 28.2 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 36.4 ($-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 67.0, 68.8, 69.3, 70.5, 70.6, 70.6, 70.7, 70.7, 70.9, 70.9 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$); 80.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 128.1, 129.9 ($-\text{CHAr-}$); 133.2 ($-\text{CAr-SO}_2\text{-}$); 144.9 ($-\text{CAr-CH}_3$); 171.0 ($-\text{CO-}$).

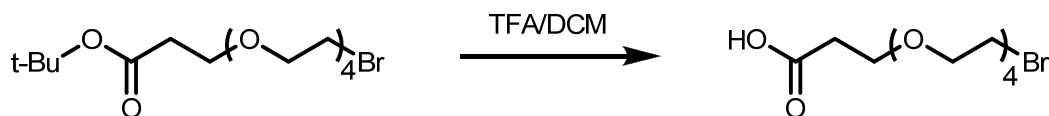
4.2.4 Darstellung von $\text{Br}(\text{PEO})_5\text{COOtBu}$



$\text{HO}(\text{PEO})_5\text{COOtBu}$ (2.19 g, 6.8 mmol, 1.0 eq) und Tetrabromomethan (5.73 g, 17 mmol, 2.5 eq) wurden in 150 mL MeCN gelöst. Bei 0 °C wurde Triphenylphosphin (4.51 g, 17 mmol, 2.5 eq) zur Reaktionslösung gegeben. Danach wurde die Lösung auf RT erwärmt und weitere 24 h gerührt. Nach Abfiltrieren des Niederschlags wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt (1.4 g, 52 %) wurde durch chromatographische Reinigung mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5, $R_f = 0.20$) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.42 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 2.48 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 3.45 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$); 3.56-3.72 (m, 14H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 3.79 (t, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$).

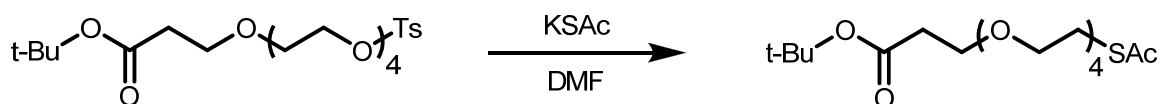
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.2 ($-\text{CH}_3$); 30.4 ($-\text{CH}_2\text{-Br}$); 36.4 ($-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 67.0 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 70.5, 70.6, 70.6, 70.7, 70.8, 71.3 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$); 89.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 171.0 ($-\text{CO-}$).

4.2.5 Darstellung von Br(PEO)₅COOH

In CH₂Cl₂ wurde bei 0 °C TFA im Überschuss zu Br(PEO)₅COOtBu (1.4 g, 2.6 μmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt (1.1 g, 95 %) erhielt man durch Trocknung im Hochvakuum.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.60 (t, 2H, -CH₂-CO-); 3.45 (t, 2H, -CH₂Br); 3.60-3.69 (m, 12H, -CH₂-O-); 3.75 (t, 2H, -O-CH₂-CH₂-CO-); 3.79 (t, 2H, -O-CH₂-CH₂Br).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 30.2 (-CH₂-Br); 34.7 (-CH₂-CO-); 70.2, 70.3, 70.4, 70.1 (-CH₂-O-); 175.8 (-CO-).

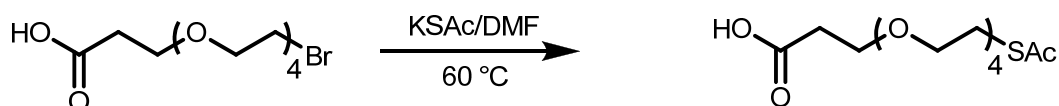
4.2.6 Darstellung von AcS(PEO)₅COOtBu

TsO(PEO)₅COOtBu (4.36 g, 9.1 mmol, 1.0 eq) wurde in trockenem DMF (30 mL) gelöst und zu einer Lösung von Kaliumthiolacetat (1.51 g, 13.2 mmol, 1.5 eq) in trockenem DMF (30 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT unter Schutzgas für 48 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Zu dem Gemisch wurde Wasser gegeben. Mit Salzsäure (1 N) wurde der pH-Wert der Lösung auf 2 bis 3 eingestellt. Zur Extraktion wurde CH₂Cl₂ der Reaktionsmischung zugeführt. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Nach chromatographischer Reinigung mit CH₂Cl₂/MeOH (95:5, R_f = 0.87) erhielt man ein braunes öliges Produkt (2.75 g, 79 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.30 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.18 (s, 3H, $-\text{S}-\text{CO}-\text{CH}_3$); 2.34 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 2.93 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.41-3.52 (m, 14H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3.56 (t, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 27.9 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 28.6 ($-\text{CO}-\text{CH}_3$); 30.3 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 36.1 ($-\text{CH}_2-\text{s}-$); 67.0, 69.5, 70.1, 70.2, 70.3, 70.4, 70.4, 77.2 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$); 80.1 ($-\text{CH}-\text{O}-$); 170.5 ($-\text{CO}-\text{O}-$); 194.9 ($-\text{S}-\text{CO}-$).

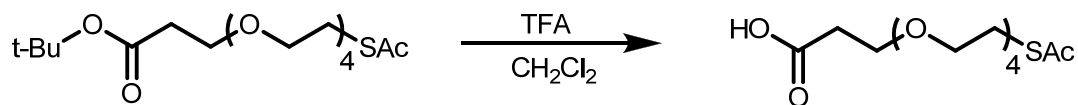
4.2.7 Darstellung von $\text{AcS}(\text{PEO})_5\text{COOH}$ ausgehend von $\text{Br}(\text{PEO})_5\text{COOH}$



$\text{Br}(\text{PEO})_5\text{COOH}$ (5.06 g, 15.4 mmol, 1.0 eq) wurde im Vakuum getrocknet und unter Argon in 80 mL DMF gelöst. Nach der Zugabe von Kaliumacetat (2.03 g, 17.8 mmol, 1.2 eq) wurde die Reaktionslösung bei 60 °C für 95 h gerührt. Nach der Entfernung von DMF im Hochvakuum wurde das Gemisch mit Wasser/ CH_2Cl_2 extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Ein braunes öliges Produkt (1.8 g, 36 %) wurde nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5, $R_f = 0.32$) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.31 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 3.05 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.60 (t, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.63-3.70 (m, 12H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3.77 (t, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 11.11 (s, 1H, $-\text{COOH}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.6 ($-\text{CH}_3$); 30.4 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); 34.6 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 66.3 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 69.7, 70.0, 70.1, 70.2, 70.3 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ and $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$); 177.2 ($-\text{COOH}$); 197.5 ($-\text{S}-\text{CO}-$).

4.2.8 Darstellung von AcS(PEO)₅COOH ausgehend von AcS(PEO)₅COOtBu

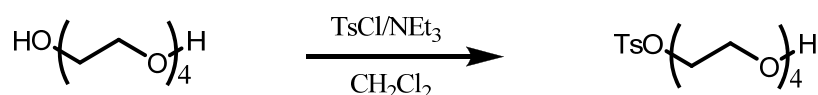
AcS(PEO)₅COOtBu (2.3 g, 6.0 mmol, 1.0 eq) wurde in 20 mL CH₂Cl₂ gelöst. Bei 0 °C wurde Trifluoressigsäure (2.2 mL, 29.6 mmol, 4.9 eq) zu der Reaktionsmischung zugegeben. Danach wurde die Reaktionslösung auf RT erwärmt und für weitere 16 h gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde ein braunes öliges Produkt (1.8 g, 93 %) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.31 (s, 3H, -CH₃); 2.64 (t, 2H, -CH₂-CO-); 3.05 (t, 2H, -CH₂-S-); 3.60 (t, 2H, -O-CH₂-CH₂-S-); 3.63-3.70 (m, 12H, -CH₂-CH₂-O-); 3.77 (t, 2H, -O-CH₂-CH₂-CO-); 11.11 (s, 1H, -COOH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 28.6 (-CH₃); 30.4 (-CH₂-S-); 34.6 (-CH₂-CO-); 66.3 (-O-CH₂-CH₂-CO-); 69.7, 70.0, 70.1, 70.2, 70.3 (-CH₂-CH₂-O- and -CH₂-CH₂-S-); 177.2 (-COOH); 197.5 (-S-CO-).

4.2.9 Darstellung von TsO(PEO)₄OH

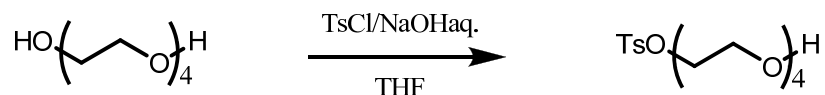
Methode A:



Zu einer Lösung von TEG (50 mL, 0.290 mol, 2 eq) in CH₂Cl₂ (120 mL) wurde NEt₃ (30.3 mL, 0.217 mol, 1.5 eq) unter Argonatmosphäre gegeben. Bei 0 °C wurde TsCl (27.92 g, 0.145 mol, 1 eq) der Reaktionslösung zugeführt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und für 24 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Wasser (3 × 100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit CH₂Cl₂ (100 mL) gewaschen.

Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Salzsäure (1 N) gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Ein hellgelbes Rohprodukt wurde durch Entfernung des Lösungsmittels erhalten.

Methode B:

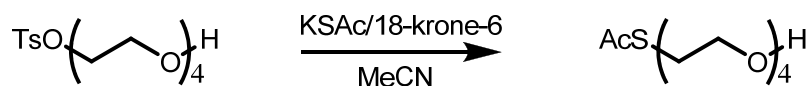


Natriumhydroxid (5.5 g, 137.5 mmol, 1.5 eq) wurde in 30 mL Wasser gelöst und zu einer Lösung von TEG (157 mL, 904.2 mmol, 10 eq) in 30 mL THF gegeben. Bei 0 °C wurde TsCl (18.1 g, 94.9 mmol, 1.0 eq) in 100 mL THF zu der Reaktionslösung langsam zugetropft. Nach Lösung des TsCl wurde das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und weitere 24 h gerührt. Nach Entfernung von THF wurden Wasser und CHCl_3 zum Extrahieren zugegeben. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Ein öliges Produkt (33.0 g, 99 %, nach TsCl) wurde nach Entfernung von Lösungsmittel erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 2.44 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 3.53-3.75 (m, 14H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 4.16 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OTs}$); 7.32 (d, 2H, $-\text{CHAr}-$); 7.78 (d, 2H, $-\text{CHAr}-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ ppm: 21.7 ($-\text{CH}_3$); 61.9 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$); 68.9, 69.3, 70.5, 70.6, 70.8, 70.9 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 72.6 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$); 128.1, 129.9 ($-\text{CHAr}-$); 133.2 ($-\text{CAr}-\text{SO}_2-$); 144.9 ($-\text{CAr}-\text{CH}_3$).

4.2.10 Darstellung von $\text{AcS(PEO)}_4\text{OH}$



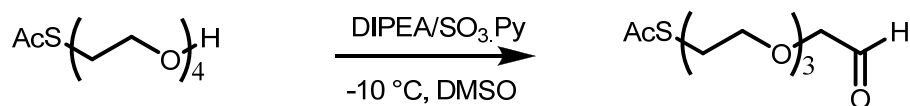
Zu einer Lösung von $\text{TsO(PEO)}_4\text{OH}$ (33.0 g, 9.5 mmol, 1.0 eq) in 100 mL MeCN wurden Kaliumacetat (16.2 g, 142 mmol, 1.5 eq) und 18-Krone-6 (25 g, 94.5 mmol, 1.0 eq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag

wurde abfiltriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde entfernt und das Zwischenprodukt wurde mit CH_2Cl_2 und NaCl -Lösung extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase mit Kaliumkarbonat-Lösung extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Ein braunes öliges Produkt (20 g, 83.7 %) wurde nach Reinigung durch Säulenchromatographie mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.32 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 3.07 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$); 3.52-3.76 (m, 14H, $-\text{O-CH}_2\text{-}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.9 ($-\text{CH}_3$); 30.6 ($-\text{CH}_2\text{-S-}$); 61.9 ($-\text{CH}_2\text{-OH}$); 69.9, 70.4, 70.5, 70.6, 70.8, 70.8 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$); 195.6 ($-\text{CO-}$).

4.2.11 Darstellung von $\text{AcS}(\text{PEO})_3\text{CH}_2\text{CHO}$

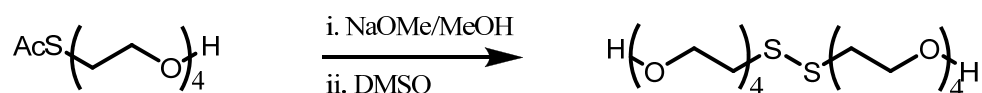


Bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ wurden Diisopropylethylamin (22.4 mL, 131.6 mmol, 7 eq), DMSO (13.4 mL, 188.0 mmol, 10 eq) und Sulfurtrioxidpyridin (12 g, 75.4 mmol, 4 eq) unter Schutzgas zu einer Lösung von $\text{AcS}(\text{PEO})_4\text{OH}$ (4.76 g, 18.8 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (100 mL) gegeben und 2 h gerührt. PBS-Puffer (40 mL, pH 7.4) wurde zu der Reaktionsmischung zugefügt. Die organische Phase wurde mit Wasser ($2 \times 30\text{ mL}$) und mit gesättigter NaCl -Lösung (30 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt (3.4 g, 72 %) durch Säulenchromatographie (EtOAc/Pentan , 1:10) gereinigt.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.31 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 3.06 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$); 3.52-3.76 (m, 10H, $-\text{O-CH}_2\text{-}$); 4.14 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CO-}$); 9.71 (s, 1H, $-\text{CHO}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.9 ($-\text{CH}_3$); 30.6 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); 69.9, 70.4, 70.7, 70.8, 70.9, 71.3 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$); 77.0 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHO}$); 195.4 ($-\text{S}-\text{CO}-$); 201.0 ($-\text{CHO}$).

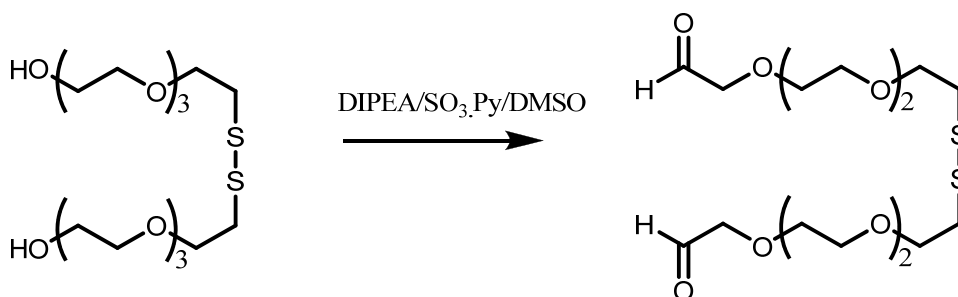
4.2.12 Darstellung von $(\text{HO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$



$\text{AcS}(\text{PEO})_4\text{OH}$ (1.8 g, 7.1 mmol, 1 eq) wurde in trockenem MeOH (50 mL) gelöst. Danach wurde Natriummethoxid (1.2 g, 21.3 mmol, 3 eq) zu der Reaktionslösung gegeben. Das Gemisch wurde bei RT für 1 h gerührt. Mit Amberlyst 15 wurde die Reaktionslösung neutralisiert und abfiltriert. Nach Zugabe von DMSO (1.5 mL) wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Durch Trocknen wurde das Rohprodukt (0.97 g, 65 %) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.89 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.60-3.75 (m, 28H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$).

4.2.13 Darstellung von $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$



Bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ wurden Diisopropylethylamin (3.2 mL, 18.4 mmol, 8 eq), DMSO (3.3 mL, 46 mmol, 20 eq) und Sulfurtrioxidpyridin (4.4 g, 27.6 mmol, 12 eq) unter Schutzgas zu einer Lösung von $(\text{HO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ (0.97 g, 2.3 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (80 mL) gegeben und über Nacht gerührt. PBS-Puffer (30 mL, pH 7.4) wurde der Reaktionsmischung zugefügt. Die

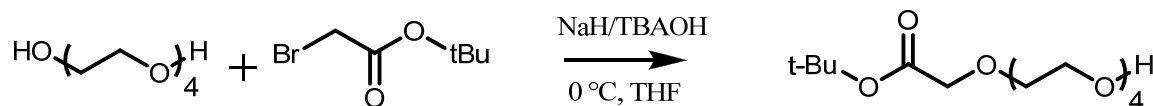
organische Phase wurde mit Wasser (2×30 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abfiltrieren und Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt (0.67 g, 68 %) durch Säulenchromatographie (EtOAc/Pentan, 1:10) gereinigt.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.88 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.60-3.77 (m, 20H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 4.16 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 9.73 (s, 2H, $-\text{CHO}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 38.6 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); 69.7, 70.5, 70.8, 70.9, 71.4 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$); 77.0 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHO}$); 201.1 ($-\text{CHO}$).

IR (cm^{-1}): 3409 (b), 2868 (b), 1733 (m), 1108 (s).

4.2.14 Darstellung von $\text{HO}(\text{PEO})_4\text{CH}_2\text{COOtBu}$

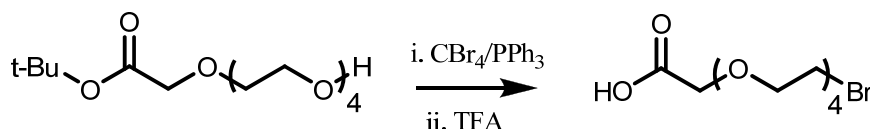


TEG (15 mL, 86.5 mmol, 1.0 eq) wurde in trockenem THF (50 mL) gelöst. Bei 0 °C wurden NaH (1.0 g, 26 mmol, 0.33 eq), TBAOH (kat.) und tert-Butyl-2-bromoacetat (3.8 mL, 26 mmol, 0.33 eq) der Reaktionslösung zugegeben. Bei RT wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Nach Entfernung des THF wurde Wasser (30 mL) zugefügt und mit CH_2Cl_2 (3×50 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts (3.1 g, 38.7 % berechnet nach tert-Butyl-2-bromoacetat) erfolgte durch Säulenchromatographie (CH_2Cl_2 :MeOH = 95:5).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.44 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 3.55-3.71 (m, 16H, $-\text{CH}_2\text{O}-$); 3.98 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.2 ($-\text{CH}_3$); 61.8 ($-\text{CH}_2\text{-OH}$); 70.5, 70.6, 70.7, 70.8, 72.6 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$); 81.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 169.7 ($-\text{COOH}$).

4.2.15 Darstellung von $\text{Br}(\text{PEO})_4\text{CH}_2\text{COOH}$



Zu einer Lösung von $\text{tBuOOCCH}_2(\text{PEO})_4\text{OH}$ (3.1 g, 10.1 mmol, 1.0 eq) und Tetrabromomethan (5.0 g, 15.1 mmol, 1.5 eq) in CH_2Cl_2 (100 mL) wurde Triphenylphosphin (4.0 g, 15.1 mmol, 1.5 eq) bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zugegeben. Danach wurde die Reaktionsmischung bei RT für 24 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst durch Säulenchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5$) gereinigt und wieder in CH_2Cl_2 (40 mL) gelöst. Dieser Lösung wurden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ ca. 10 g TFA zugefügt und die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein braunes öliges Rohprodukt (1.767 g, 55 %) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.45 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$); 3.61-3.75 (m, 12H, $-\text{CH}_2\text{O-}$); 3.79 (t, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$); 4.31 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO-}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 30.3 ($-\text{CH}_2\text{Br}$); 68.9, 70.3, 70.4, 70.5, 70.6, 70.7, 71.2 ($-\text{CH}_2\text{-O-}$); 172.6 ($-\text{COOH}$).

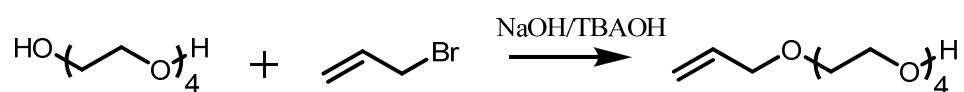
4.2.16 Darstellung von $\text{AcS}(\text{PEO})_4\text{CH}_2\text{COOH}$



HOOCCH₂(PEO)₄Br (1.767 g, 5.6 mmol, 1.0 eq) und Kaliumacetat (2.786 g, 24 mmol, 4.3 eq) wurden in 80 mL DMF gelöst und die Reaktionslösung bei 60 °C für 24 h unter Schutzgas gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Hochvakuum wurde Wasser zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Mit Salzsäure (1 N) wurde der pH-Werte der wässrige Lösung auf ~pH 2 eingestellt. Zur Extraktion wurde Ethylacetat dem Gemisch zugegeben und die kombinierten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet. Ein braunes öliges Rohprodukt (0.2 g, 11 %) erhielt man durch Säulenchromatographie (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.25 (s, 3H, -CH₃); 3.01 (t, 2H, -CH₂-S-CO-); 3.48-3.72 (m, 14H, -CH₂O-); 4.16 (t, 2H, -CH₂-COO-).

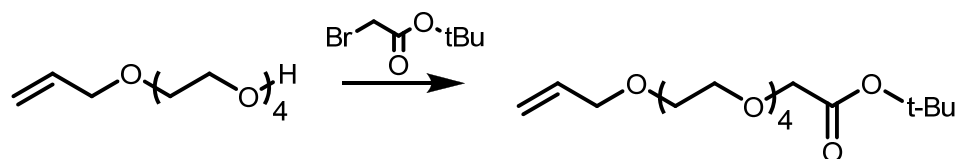
4.2.17 Darstellung von HO(PEO)₄CH₂CH=CH₂



TEG (70 mL, 403.6 mmol, 9.7 eq), Allylbromid (3.5 mL 41.4 mmol, 1 eq), TBAOH (0.28 g, 8.2 mmol, 0.2 eq) und NaOH-Lösung (25 mM, 8.3 mL, 5 eq) wurden in 100 mL THF gelöst. Diese Reaktionsmischung wurde 72 h lang refluxiert und das Lösungsmittel danach entfernt. In NaCl-Lösung wurde das Reaktionsgemisch mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und ein öliges Rohprodukt (10.56 g, 11 %, berechnet nach TEG) durch Säulenchromatographie (CH₂Cl₂:MeOH = 95:5) gewonnen.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.53-3.69 (m, 16H, -CH₂O-); 3.97 (m, 2H, -CH-CH₂-CO-); 5.13 (m, 1H, CH₂=CH-); 5.23 (m, 1H, CH₂=CH-); 5.86 (m, -CH-).

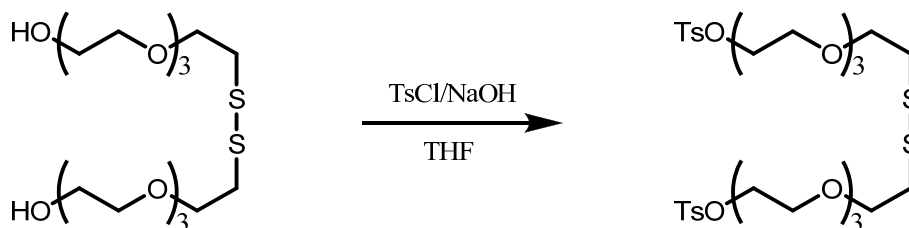
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 61.7 (-CH₂-OH); 69.2, 69.5, 70.4, 70.6, 70.7 (-CH₂-O-); 72.6 (-CH-CH₂-CO-); 117.1 (CH₂=CH-); 134.8 (-CH-).

4.2.18 Darstellung von $t\text{BuOOCCH}_2(\text{PEO})_4\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 

$\text{HO}(\text{PEO})_4\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (10.54 g, 45 mmol, 1.0 eq) und Tetrabutylammoniumiodid (3.8 g, 11.3 mmol, 0.25 eq) wurden in CH_2Cl_2 (50 mL) gelöst. Nach Zugabe von NaOH (18 g, 450 mmol, 10 eq) und tert-Butyl-2-bromoacetat (46.5 g, 315 mmol, 7 eq) wurde die Reaktionslösung bei RT für 15 h gerührt. Danach wurde NaCl-Lösung (1N, 50 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3×50 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte die Reinigung des öligen Rohprodukts (9.6 g, 61 %) durch Säulenchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.44 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 3.53-3.76 (m, 16H, $-\text{CH}_2\text{O}-$); 3.98 (m, 4H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ und $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 5.14 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}-$); 5.24 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}-$); 5.88 (m, 1H, $-\text{CH}-$).

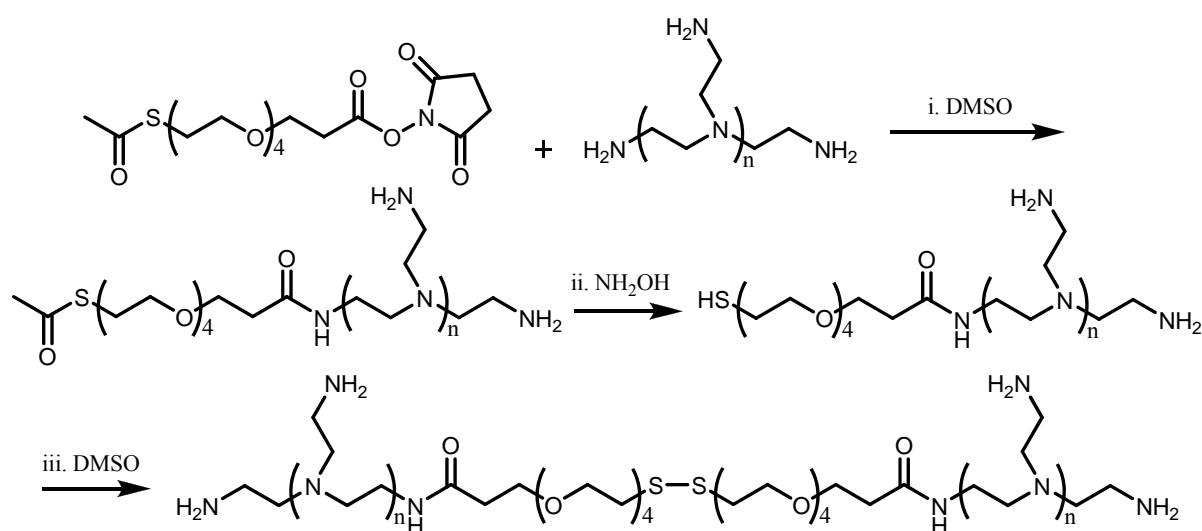
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 28.2 ($-\text{CH}_3$); 69.2, 69.5, 70.6, 70.7, 70.9 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$); 72.3 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 81.5 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 117.0 ($\text{CH}_2=\text{CH}-$); 134.9 ($-\text{CH}-$); 169.7 ($-\text{COO}-$).

4.2.19 Darstellung von $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ 

Zu einer Lösung von $(\text{HO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ (0.178 g, 0.43 mmol, 1.0 eq) in THF wurde Natronlauge (0.1 mL, 2 N, 2.4 eq) zugegeben. Bei 0 °C wurde TsCl (0.162 g, 0.85 mmol, 2.0 eq) zu der Reaktionsmischung gegeben und die Reaktionslösung bei RT über Nacht gerührt. Nach der Entfernung von THF wurde die Mischung in Wasser suspendiert und mit CH_2Cl_2 dreimal extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und abrotiert. Die Reinigung des Produkts (0.173 g, 56 %) erfolgte durch Säulenchromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:1, $R_f = 0.68$).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.44 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 2.87 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$); 3.56-3.75 (m, 24H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 4.15 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-OTs}$); 7.34 (d, 4H, $-\text{CHAR-}$); 7.79 (d, 4H, $-\text{CHAR-}$).

4.2.19 PEG-PEI-Copolymerisation mit $\text{SAT}(\text{PEO})_4$

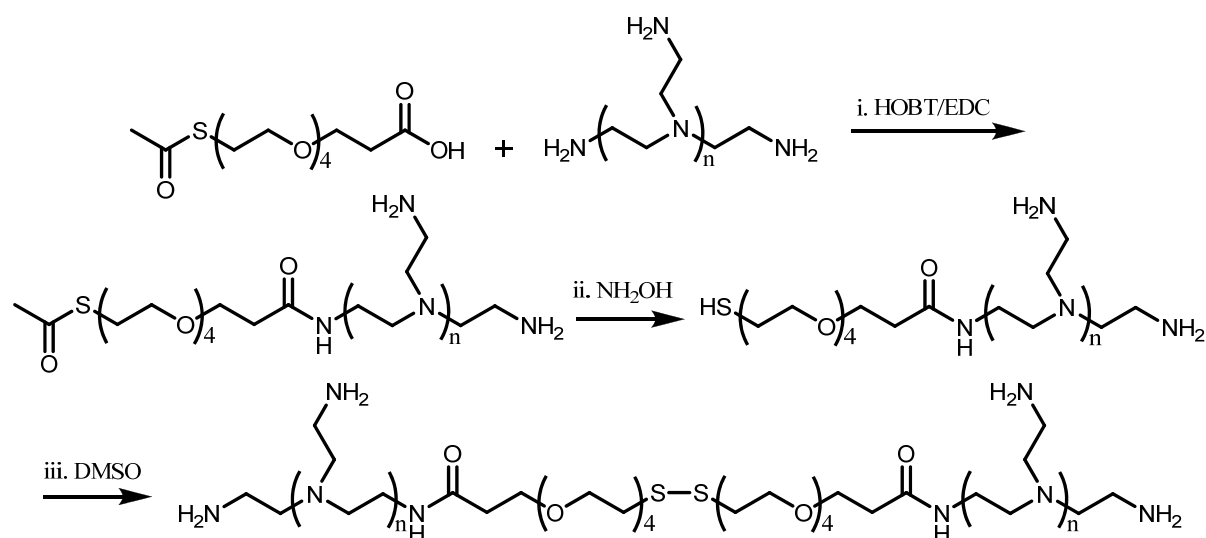


Das verzweigte PEI 2000 (78.4 mg, 39 μmol , 1.0 eq) wurde in 20 mL PBS-Lösung (pH 7.2) gelöst. Dazu wurde das kommerzielle Linker $\text{SAT}(\text{PEO})_4$ (33 mg, 78 μmol , 2.0 eq) zugetropft. Nach 62 h wurde Hydroxylamin (0.55 g, 7.8 mmol, 200 eq) in PBS-Lösung (16 mL) der Reaktionsmischung zugegeben. Das Gemisch wurde weitere 24 h bei RT gerührt. Nach der

Zugabe von DMSO (10 mL) wurde die Mischung weitere 3 d gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer 1000 Da Membran gewonnen.

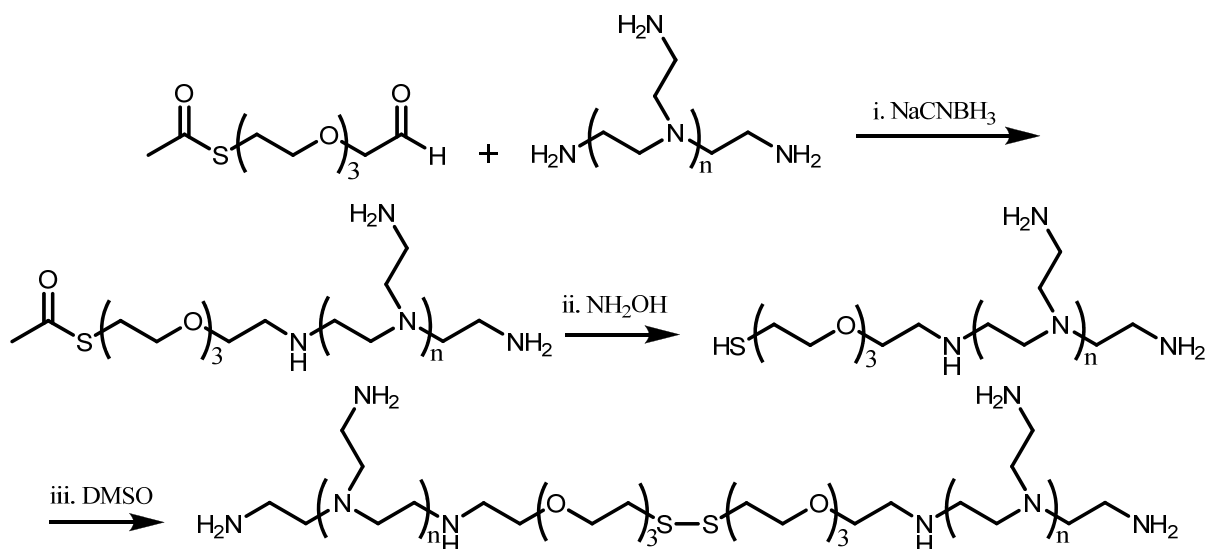
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm: 2.0-2.8 ($-\text{CH}_2-\text{NH}-$); 3.2-3.6 ($-\text{CH}_2\text{O}-$); 8.87 ($-\text{NH}-\text{CO}-$).

4.2.21 PEG-PEI-Copolymerisation mit $\text{AcS(PEO)}_5\text{COOH}$



Es wurde PEI 2000 (80.3 mg, 39.3 μmol , 1.0 eq) in DMSO (2 mL) gelöst und bei RT für 2 h gerührt. Nacheinander wurden der Linker $\text{AcS(PEO)}_5\text{COOH}$ (190.3 mg, 586.6 μmol , 14.9 eq), HOBT (98.8 mg, 716.5 μmol , 18.2 eq) in DMSO (1 mL) und EDC (138.7 mg, 716.3 μmol , 18.2 eq) zugegeben und bei RT 60 h gerührt. Nach der Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer 1000 Da Membran wurde Hydroxylamin (215 mg, 3.1 mmol, 77.9 eq) zugegeben. Nach 5 h wurde DMSO (3 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 2 d gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer Membran von 1000 Da.

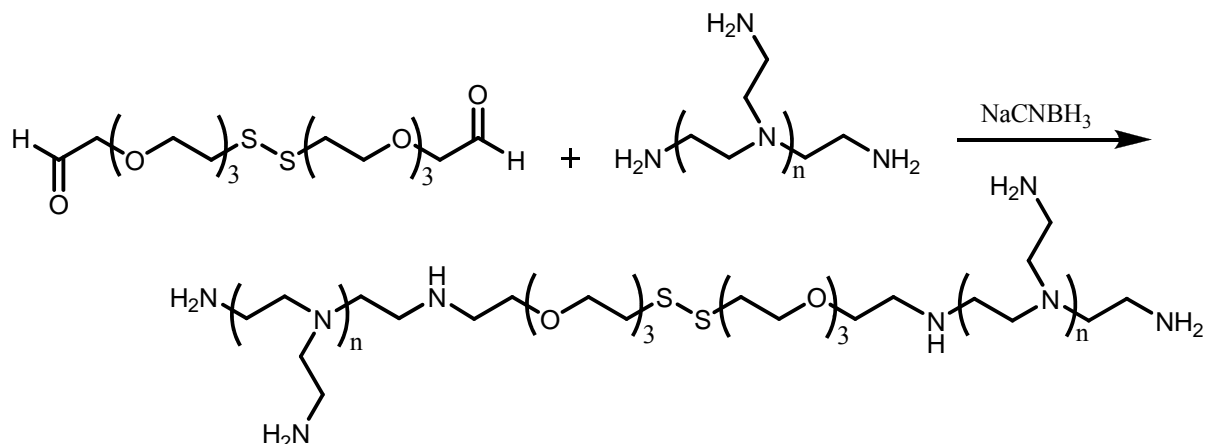
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm: 2.4-3.0 ($-\text{CH}_2-$, PEI-Block); 3.6-3.8 ($-\text{CH}_2-$, PEG-Block).

4.2.22 PEG-PEI-Copolymerisation mit $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ 

Es wurde PEI 2000 (100.3 mg, 49.1 μmol , 1.0 eq) in 2 mL MeOH gelöst und bei RT 2 h gerührt. Unter Rühren wurde der Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ (184.6 mg, 0.74 mmol, 15.0 eq) zugegeben. Anschließend wurde NaCNBH_3 (60.5 mg, 0.91 mmol, 18.6 eq) in 100 μL NaOH (1 N) und 900 μL PBS Lösung zugeführt und das gesamte Reaktionsgemisch für 4 d gerührt. Nach Dialyse (1000 Da) gegen destilliertes Wasser wurde Hydroxylamin (279.6 mg, 4.0 mmol, 81.1 eq) zugegeben und über Nacht gerührt. Nach der Zugabe von DMSO wurde die Reaktionsmischung weiterhin für 3 d gerührt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Dialyse (1000 Da) gegen destilliertes Wasser. Die gleiche Methode wurde ebenfalls bei pH 5 bis 6 durchgeführt.

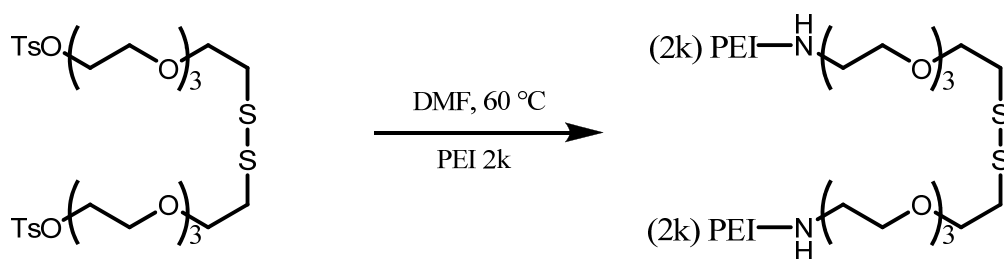
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm: 2.6-3.0 ($-\text{CH}_2-$, PEI-Block); 3.0-3.8 ($-\text{CH}_2-$, PEG-Block).

4.2.23 PEG-PEI-Copolymerisation mit Linker (OHCCH₂(PEO)₃S)₂



Es wurde PEI 2000 (83.2 mg, 40.8 μmol , 1.0 eq) in 1 mL MeOH gelöst und bei RT für 2 h gerührt. Der Linker (OHCCH₂(PEO)₃S)₂ (87.0 mg, 0.21 mmol, 5.1 eq) in MeOH (1.82 mL) wurde unter Rühren der Lösung zugetropft. Anschließend wurde NaCNBH₃ (35.2 mg, 0.53 mmol, 13.1 eq) in 1.5 mL PBS-Lösung zugeben. Der pH-Wert wurde mit HCl (1N) auf ca. 6 eingestellt. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde für eine Woche gerührt und das Rohprodukt mit einer 1000 Da Membran gegen Wasser dialysiert.

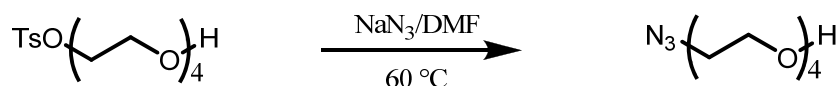
4.2.24 PEG-PEI-Copolymerisation mit Linker (TsO(PEO)₄S)₂



Verzweigtes PEI 2 kDa (136 mg, 67 μmol , 1 eq) wurde in 1.8 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von (TsO(PEO)₄S)₂ (74 mg, 0.1 mg/mL, 5 eq) wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für eine Woche gerührt. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Dialyse mit einer 1000 Da Membran gegen destilliertes Wasser.

4.3 Synthese von bioabbaubarem PEG-PEI-Copolymer durch Kupplung mittels Click-Chemie

4.3.1 Darstellung von $\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{OH}$

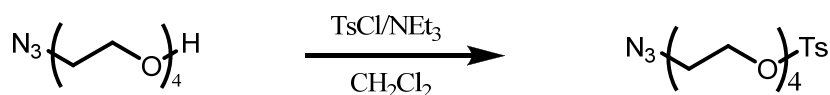


Natriumazid (9.34 g, 144 mmol, 5 eq) wurde zu Monotosylate ($\text{HO}(\text{PEO})_4\text{OTs}$) (10.0 g, 28.8 mmol, 1 eq) in 100 mL trockenem DMF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 60 °C für 16 h gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in Wasser suspendiert und mit CH_2Cl_2 extrahiert (3×100 mL). Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt (5.4 g, 85 %) erhielt man durch Entfernung des Lösungsmittels.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.35 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 3.57 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 3.60-3.74 (m, 14H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 50.7 ($-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 61.8 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$); 70.1, 70.4, 70.6, 70.7, 70.8 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ and $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 72.5 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$).

4.3.2 Darstellung von $\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{OTs}$



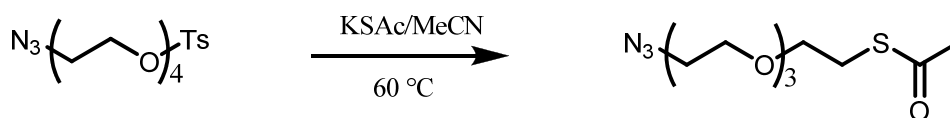
NEt_3 (5.1 mL, 36.3 mmol, 1.5 eq) wurde zu einer Lösung von $\text{HO}(\text{PEO})_4\text{N}_3$ (5.3 g, 24.2 mmol, 1 eq) in (100 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, TsCl (5.6 g, 29.0 mmol, 1.2 eq) zugegeben und die Reaktionslösung bei RT für 16 h gerührt. Nach dem Waschen mit

NaHCO₃, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung in CH₂Cl₂ wurden die kombinierten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet. Ein braunes öliges Rohprodukt (7.65 g, 84.6 %) wurde nach der Entfernung des Lösungsmittels gewonnen.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.44 (s, 3H, -CH₃); 3.37 (t, 2H, -CH₂-N₃); 3.61-3.71 (m, 12H, -CH₂-O-); 4.15 (t, 2H, -CH₂-OTs); 7.32 (d, 2H, -CHAr-); 7.78 (d, 2H, -CHAr-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 21.7 (-CH₃); 50.8 (-CH₂-N₃); 68.8, 69.4, 70.2, 70.7, 70.8, 70.9 (-CH₂-CH₂-O- and -CH₂-CH₂-N₃); 128.1, 129.9 (-CHAr-); 133.3 (-CAr-SO₂-); 144.9 (-CAr-CH₃).

4.3.3 Darstellung von N₃(PEO)₄SAc

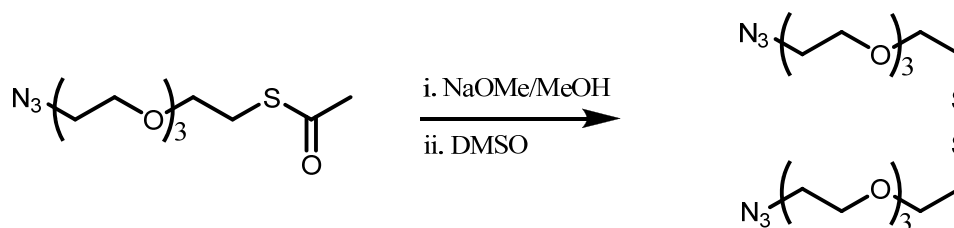


Kaliumacetat (4.68 g, 41.0 mmol, 2 eq) wurde zu einer Lösung von N₃(PEO)₄OTs (7.65 g, 20.5 mmol, 1 eq) in MeCN (100 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 60 °C erwärmt und 16 h gerührt. Nach Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags wurde das Lösungsmittel des Filtrats entfernt. Das erhaltene Produkt wurde in Wasser suspendiert und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt (1.91 g, 33 %) erhielt man nach der Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Et₂O/Pentan (4:6 und dann 6:4).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.33 (s, 3H, -CH₃); 3.09 (t, 2H, -CH₂-S-); 3.39 (t, 2H, -CH₂-N₃); 3.57-7.71 (m, 12H, -CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-N₃ and -O-CH₂-CH₂-S-).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 29.0 (-CO-CH₃); 30.7 (-CH₂-S-); 50.8 (-CH₂-N₃); 69.9, 70.2, 70.5, 70.8, 70.9 (-CH₂-CH₂-O- and -CH₂-CH₂-N₃); 195.6 (-CO-S-).

IR (cm⁻¹): 2866 (b), 2098 (s), 1688 (s), 1098 (s), 624 (s).

4.3.4 Darstellung von $(\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{S})_2$ ausgehend von $\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{S}\text{Ac}$ 

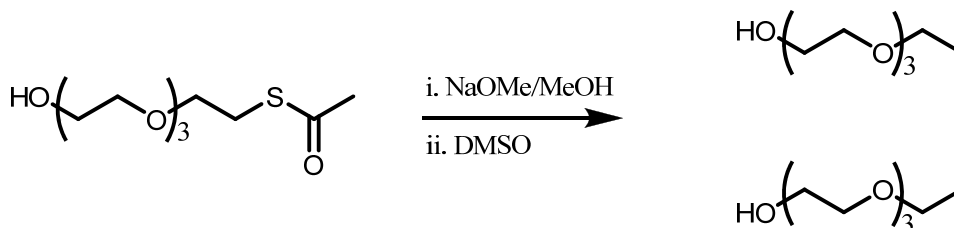
NaOMe (0.86 g, 2 eq, 15.9 mmol) wurde zu einer Lösung von $\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{S}\text{Ac}$ (2.20 g, 7.93 mmol, 1 eq) in trockenem MeOH (50 mL) gegeben. Nach 2-stündigem Rühren bei RT wurde Amberlyst 15 zu der Reaktionslösung gegeben, um die Reaktionslösung zu neutralisieren. Beim pH 7 wurde das Gemisch abfiltriert. DMSO (1.2 mL) wurde zu dem Filtrat gegeben und weitere 20 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (CHCl_3 : MeOH = 10: 1) gereinigt und ein braunes öliges Produkt (1.734 g, 93 %) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.88 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.38 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 3.60-3.69 (m, 20H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ and $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.73 (t, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 38.6 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); 50.8 ($-\text{CH}_2-\text{N}_3$); 69.8, 70.2, 70.5, 70.7, 70.8, 70.9 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ and $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$).

IR (cm^{-1}): 2865 (b), 2099 (s), 1113 (s).

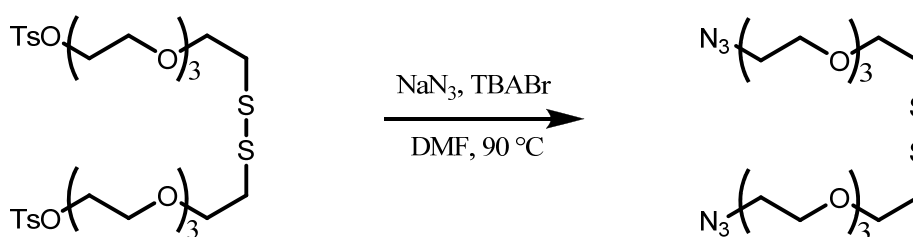
ESI- MS (m/z): berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$ (MNa^+) 491.1723, gefunden 491.1717.

4.3.5 Darstellung von $(\text{HO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ 

NaOMe (1.0 g, 18.5 mmol, 3.1 eq) wurde zu HO(PEO)₄SAc (1.5 g, 5.9 mmol, 1.0 eq) in 50 mL MeOH gegeben und bei RT für 3 h gerührt. Die Neutralisation der Reaktionslösung erfolgte mit Amberlyst 15. Nach Zugabe von DMSO (1 mL) wurde das Gemisch über Nacht gerührt. Ein öliges Produkt (0.73 g, 59 %) wurde nach Entfernung des Lösungsmittels erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.89 (t, 4H, -CH₂-S-); 3.54-3.75 (m, 28H, -CH₂-O-).

4.3.6 Darstellung von (N₃(PEO)₄S)₂ ausgehend von (TsO(PEO)₄S)₂

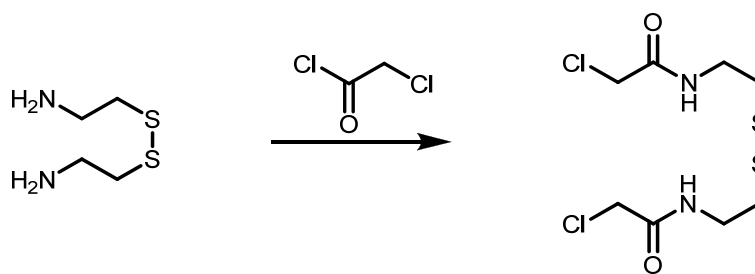


Zu einer Lösung von (TsO(PEO)₄S)₂ (0.173 g, 0.24 mmol, 1.0 eq) in DMF (5 mL) wurden Natriumazid (0.19 g, 2.92 mmol, 12 eq), Tetrabutylammoniumbromid (5 mg, kat.) und 0.5 mL DMSO gegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 90 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde DMF im Hochvakuum entfernt und CH₂Cl₂ dem Reaktionsgemisch zugegeben. Durch Abfiltrieren in Kieselgur und anschließende Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt (0.86 g, 76 %) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.88 (t, 4H, -CH₂-S-); 3.38 (t, 4H, -CH₂-N₃); 3.60-3.69 (m, 20H, -CH₂-CH₂-O- and -O-CH₂-CH₂-S-); 3.73 (t, 4H, -CH₂-CH₂-N₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 38.5 (-CH₂-S-); 50.7(-CH₂-N₃); 69.8, 70.2, 70.5, 70.7, 70.8, 70.9 (-CH₂-CH₂-O- and -CH₂-CH₂-N₃).

4.3.7 Bis-Acylierung von Cystamin mit Chloracetylchlorid

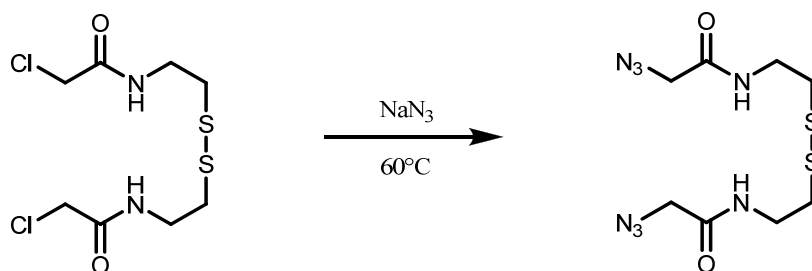


Cystamin wurde in Natronlauge (2 N) bei RT für 10 Minuten gerührt, um das Hydrochlorid zu neutralisieren. Dann wurden Cystamin (1.8 g, 11.8 mmol, 1 eq) und NEt₃ (4.1 mL, 29.1 mmol, 2.5 eq) in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst. Bei 0 °C wurde 2-Chloroacetylchlorid (2.0 mL, 29.5 mmol, 2.5 eq) der Reaktionsmischung langsam zugetropft. Nach Erwärmen auf RT wurde die Reaktionslösung für 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde nacheinander mit je 50 mL Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung, HCl (2 N) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des CH₂Cl₂ wurde das Rohprodukt in MeOH gelöst und mit Et₂O umgefällt. Der Niederschlag (1.15 g, 32 %) wurde abfiltriert und mit Et₂O gewaschen.

¹H NMR (300 MHz, d⁶-DMSO) δ ppm: 2.80 (t, 4H, -CH₂-S-); 3.39 (t, 4H, -CH₂-NH-CO-); 4.01 (s, 4H, -CH₂-Cl); 8.40 (t, 2H, -NH-CO-).

¹³C NMR (75 MHz, d⁶-DMSO) δ ppm: 36.8 (-CH₂-S-); 38.3 (-CH₂-NH-CO-); 42.5 (-CH₂-Cl); 166.1 (-NH-CO-).

4.3.8 Darstellung von mit Azidoacetamid modifiziertem Cystamin



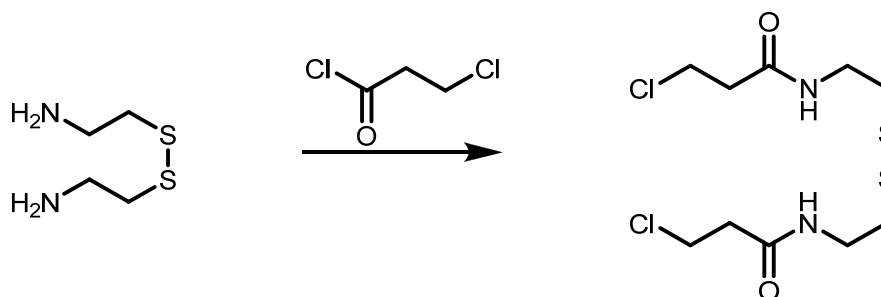
Natriumazid (0.77 g, 11.8 mmol, 3.1 eq) wurde zu einer Lösung von N,N'-(2,2'-disulfanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(2-chloroacetamide) (1.15 g, 3.8 mmol, 1 eq) in 22 mL DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch mit CH₂Cl₂ verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet. Nach der Entfernung von CH₂Cl₂ und DMF im Vakuum wurden MeOH (2 mL) und Et₂O (100 mL) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde als Rohprodukt (0.76 g, 63 %) nach Abfiltrieren und Waschen mit Et₂O erhalten.

¹H NMR (300 MHz, d⁶-DMSO) δ ppm: 2.80 (t, 4H, -CH₂-S-); 3.40 (t, 4H, -CH₂-NHCO); 3.83 (s, 4H, -CH₂-N₃); 8.31 (s, 2H, -NH-CO-).

¹³C NMR (75 MHz, d⁶-DMSO) δ ppm: 36.9 (-CH₂-S-); 38.0 (-CH₂-NH-CO); 50.8 (-CH₂-N₃); 167.4 (-NH-CO-).

IR (cm⁻¹): 3298 (m), 3079 (b), 2099 (s), 1642 (s), 1543 (s), 1261 (s).

4.3.9 Bis-Acylierung von Cystamin mit 3-Chlorpropanoylchlorid



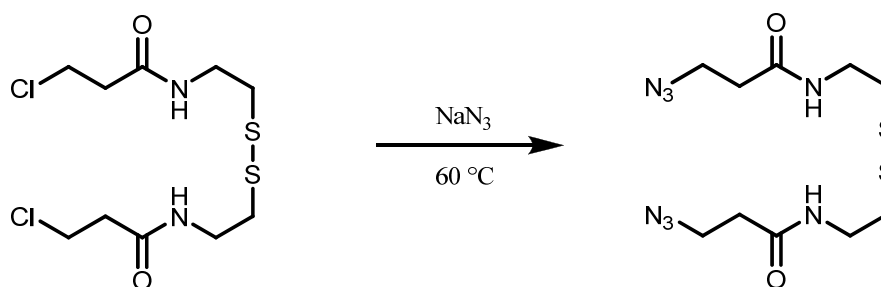
Cystamin (0.58 g, 3.8 mmol, 1 eq) und NEt₃ (1.34 mL, 9.5 mmol, 2.5 eq) wurden in 30 mL CH₂Cl₂ gelöst. Bei 0 °C wurde 3-Chlorpropanoylchlorid (0.95 mL, 9.5 mmol, 2.5 eq) der Reaktionsmischung langsam zugetropft. Nach langsamer Erwärmung auf RT wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit nacheinander mit je

30ml Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung, HCl (2 N) und gesättigter NaCl -Lösung von gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des CH_2Cl_2 wurde das Rohprodukt in MeOH (2 mL) gelöst und mit Et_2O (80 mL) umgefällt. Der Niederschlag (0.55 g, 43 %) wurde abfiltriert und mit Et_2O gewaschen.

^1H NMR (300 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 2.57 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 2.77 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$); 3.33 (q, 4H, $-\text{CH}_2\text{-NHCO-}$); 3.78 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-Cl}$); 8.21(t, 2H, $-\text{NH-CO-}$).

^{13}C NMR (75 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 37.1 ($-\text{CH}_2\text{-S-}$); 38.0 ($-\text{CH}_2\text{-NHCO-}$); 38.2 ($-\text{CH}_2\text{-CO}$); 40.9 ($-\text{CH}_2\text{-Cl}$); 169.0 ($-\text{NH-CO-}$).

4.3.10 Darstellung von 3-Azidopropanamid modifiziertem Cystamin



Natriumazid (0.37 g, 5.7 μmol , 3.2 eq) wurde zu einer Lösung von $\text{N,N}'\text{-(2,2'-disulfanediyldiethyl)bis(2-chloroacetamide)}$ (0.55 g, 1.8 μmol , 1 eq) in 10 mL DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit Wasser dreimal gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Nach der Entfernung von CH_2Cl_2 und DMF im Vakuum wurden MeOH (1 mL) und Et_2O (50 mL) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde durch Abfiltrieren und Waschen mit Et_2O als Rohprodukt (0.34 g, 51 %) erhalten.

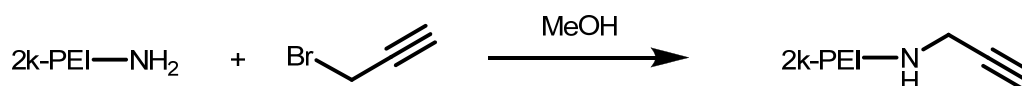
^1H NMR: (300 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 2.38 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-N}_3$); 2.77 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 3.35 (q, 4H, $-\text{CH}_2\text{-S-}$); 3.50 (t, 4H, $-\text{CH}_2\text{-NHCO-}$); 8.21 (t, 2H, $-\text{NH-CO-}$).

^{13}C NMR: (75 MHz, d^6 -DMSO) δ ppm: 34.5 ($-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 37.1 ($-\text{CH}_2\text{-S-}$); 38.0 ($-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 46.9 ($-\text{CH}_2\text{-N}_3$); 169.6 ($-\text{NH-CO-}$).

IR (cm^{-1}): 3240 (b), 2090 (s, N_3), 1631 (s), 1546 (s), 1271 (s), 1184 (m), 580 (m).

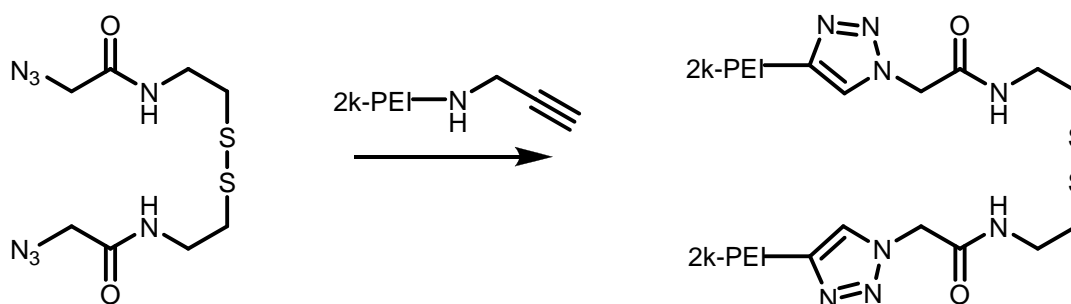
ESI- MS (m/z): berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}$ (MNa) $^+$ 369.0892, gefunden 369.0886.

4.3.11 Modifizierung von Polyethylenimin mit Propargylbromid



Zu einer Lösung von PEI 2000 (66 mg, 32.4 μmol , 1 eq) in MeOH (2 mL) wurde Propargylbromid-Lösung in 80 % Toluol (35 μL , 325 μmol , 10 eq) bei 0 °C langsam zugetropft und bei RT für 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde ohne weitere Reinigung direkt für die Polymerisation verwendet.

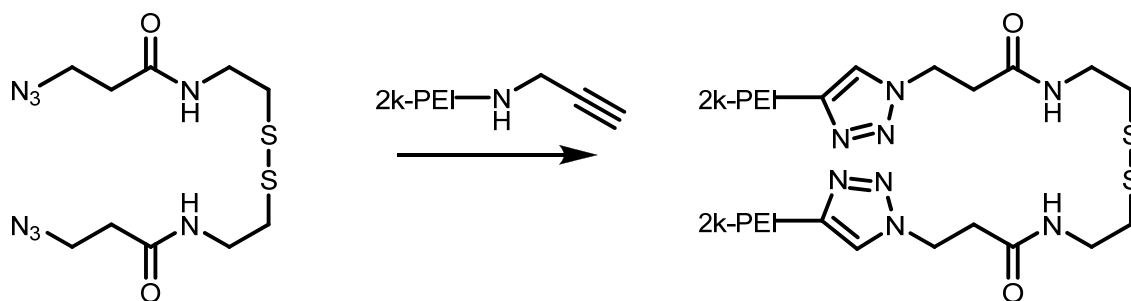
4.3.12 Polymerisation von alkin-modifiziertem PEI durch Kupplung mit dem azidoacetamid-modifiziertem Cystamin



Zu einer Lösung von PEI 2000 (0.1 g, 50 μmol , 1 eq) in DMF (0.5 mL) wurde Propargylbromid-Lösung in 80 % Toluol (108 μL , 1 mmol, 20 eq) bei 0 °C langsam zugetropft und bei RT für 24 h gerührt. Danach wurde Azidoacetamid (80 mg, 250 μmol , 5 eq) in DMF/H₂O-Mischung (2/2.5 mL) sowie Natriumascorbat und CuSO₄-Lösung (1 N, kat.) zu der Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für eine Woche gerührt. Die Reinigung erfolgte durch Membran-Dialyse gegen Wasser. Nach Gefriertrocknung wurde ein braunes Pulver (39 mg, 18 %) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ ppm: 2.5-3.3 (m, -CH₂-CH₂-N-, -CH₂-S-); 3.3-4.2 (m, -CH₂-Triazol, -CH-NH-CO-); 5.3 (s, -CH-CO-); 8.1 (s, H in Triazol-Ring).

4.3.13 Polymerisation von alkin-modifiziertem PEI durch Kupplung mit dem 3-azidopropanamid-modifizierten Cystamin

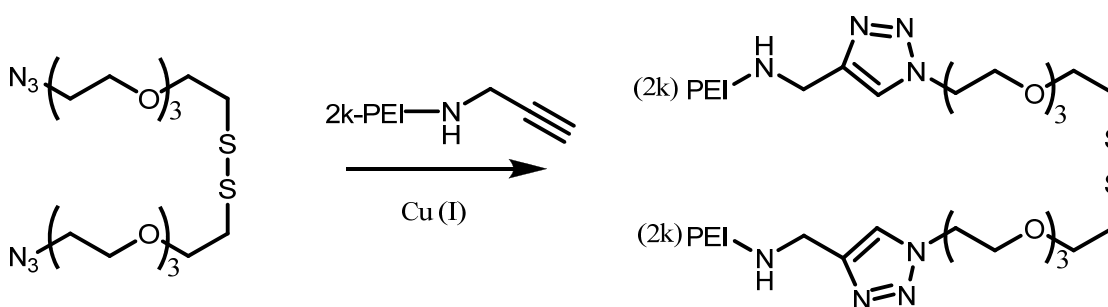


Zu einer Lösung von PEI 2000 (49.8 mg, 24 μmol , 1 eq) in MeOH (160 μL) wurde Propargylbromid-Lösung in 80 % Toluol (25.6 μL , 240 μmol , 10 eq) bei 0 °C langsam zugetropft und bei RT über Nacht gerührt. Danach wurde 3-Azidopropanamid (40 mg, 120 μmol , 5 eq) in MeOH/H₂O-Mischung (240/120 μL) sowie Natriumascorbat und CuSO₄-Lösung (1 N) in katalytischen Mengen zu der Reaktionsmischung gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für eine Woche gerührt. Die Reinigung erfolgte durch

Membran-Dialyse gegen Wasser. Nach Gefriertrocknung wurde ein hellgelbes Pulver (9.7 mg, 9.8 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ ppm: 2.5-3.3 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$); 3.3-4.2 (m, $-\text{CH}_2-$ Triazol, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-$); 8.1 (s, H in Triazol-Ring).

4.3.14 Synthese von mit 1, 2, 3-Triazol verknüpftem, disulfidhaltigem PEG-PEI-Copolymer



Zu einer Lösung von PEI 2000 (0.8526 g, 0.418 mmol, 1 eq) in MeOH (5 mL) wurde Propargylbromid-Lösung in 80 % Toluol (450 μL , 4.18 mmol, 10 eq) bei 0 °C langsam zugetropft und bei RT für 48 h gerührt. Danach wurde $(\text{N}_3(\text{PEO})_4\text{S})_2$ (0.983 g, 4.18 mmol, 10 eq) in DMSO (1 mL) sowie Natriumascorbat und CuSO_4 -Lösung (1 N) in katalytischer Menge der Reaktionsmischung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für 7 d gerührt. Die Reinigung erfolgte durch Membran-Dialyse (1000 Da) gegen destilliertes Wasser und anschließende Zentrifugation mit Vivaspin 6 (100,000 Da). Das Filtrat wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt (765 mg, 38 %) ist bei RT ein braunes Pulver.

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ ppm: 2.4-3.3 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$); 3.3-4.2 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 8.1 (s, H in Triazol-Ring).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Summary and Outlook

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wird die Synthese der neuartigen, disulfid-verbrückten, bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymeren als nicht-virale Vektoren zur Gentherapie beschrieben. Die DNA-Polyplexe der Copolymere wurden charakterisiert und auf ihre Eignung als Genvektoren für die *in-vivo*-Anwendung untersucht.

Zuerst wurde ein heterobifunktionaler Linker SMPT zur Herstellung des bioabbaubaren PEG-PEI-Copolymers verwendet. Nach der Synthese und der Charakterisierung des mit SMPT gekoppelten PEIs und des mit Thiol modifizierten PEGs (HS-PEG-SH) erfolgte die Copolymerisierung durch Bildung der neuen Disulfid-Brücken zwischen PEG und SMPT. Lineares PEI 2500 Da und verzweigtes PEI 2000 Da wurden eingesetzt. Im Vergleich zu linearem PEI 2500 hat verzweigtes PEI 2000 die Vorteile mit sich gebracht, dass es besser löslich war, und somit einfachere Reaktionsbedingungen bietet. Die Reaktivität des primären Amins war höher als die des sekundären Amins, daher wurde die Kupplungseffizienz des Linkers bei PEI 2000 auf 50 % erhöht. Das von verzweigtem PEI 2000 resultierende Produkt besitzt ein Molekulargewicht von 12 kDa. Vermutlich bestehen die an PEI gekoppelten PEG-Ketten aus mehrer PEG-Einheiten, die über Disulfid-Brücken verknüpft werden. Und es gab keine Quervernetzung zwischen PEI-Ketten. Die Darstellung dieses über SMPT verknüpften PEG-PEI-Copolymers bietet eine neue Methode, mit der bioabbaubare PEG-PEI-Copolymere über einen heterobifunktionalen Linker durch Austausch der Disulfid-Bindung synthetisiert werden können. Die Variierung der chemischen Struktur des resultierenden

Copolymers ist durch Veränderung der Ansatzverhältnisse zwischen PEI, PEG und Linker möglich. Die Quervernetzung zwischen PEI-Ketten könnte auch detailliert untersucht werden.

Zweitens wurde eine Serie der auf Tetraethylenglykol (TEG) basierten, bifunktionalen PEG-Linker zur Darstellung von PEG-PEI-Copolymere entwickelt. Der kommerzielle Linker SAT(PEO)₄ ist preisgünstiger als SMPT und wurde mit verzweigtem PEI 2000 Da durch eine Eintopfreaktion zu einem PEG-PEI-Copolymer umgesetzt. Das Molekulargewicht betrug 65 kDa vor und 8.3 kDa nach Dialyse. Die Größe des Endprodukts entspricht einer Struktur von ca. zweier PEG-PEI-Blöcken. Im GPC-Chromatogramm vor Dialyse machte das hochmolekulare Produkt einen Anteil von ca. 42 % der Polymermischung aus. Es wird vermutet, dass der Abbau des Produkts (65 kDa) von einem Disulfid-Austausch zwischen Polymer unterschiedlicher Größe verursacht wird. Der Linker AcS-PEG-COOH, der eine ähnliche Struktur und die gleiche Funktion wie SAT(PEO)₄ besitzt, wurde synthetisiert. Hierdurch wurde ermöglicht, die Copolymerisation in größeren Ansätzen und detailliert zu untersuchen. Vier unterschiedliche Methoden wurden verwendet (siehe 3.1.2.1.2), dabei überzeugten Methode II und Methode III mit einfacher Durchführbarkeit und hoher Ausbeute. Der aus Methode II entstandene Linker AcS(PEO)₅COOH wurde anschließend zur Copolymerisierung mit PEI verwendet. Im Vergleich zu dem Linker SAT(PEO)₄ ist AcS(PEO)₅COOH zwar stabiler gegen Hydrolyse, zeigte jedoch ineffizientere Kupplungsfähigkeit. Vermutlich ist die höhere Reaktivität des NHS-Esters gegenüber der Aminfunktion dafür verantwortlich. Copolymerisation durch Bildung von Disulfid und mittels Amidierung wurde versucht. Es wurden ähnliche Ergebnisse beider Methoden erhalten. Linker AcS(PEO)₃CH₂CHO und (OHCCH₂(PEO)₃S)₂ wurden synthetisiert und charakterisiert, wobei der Aldehyd höhere Reaktivität gegenüber Amin als die Carbonsäure aufweist. Bei Copolymerisation mit AcS(PEO)₃CH₂CHO wurde ein hochmolekulares Polymerprodukt von ca. 380 kDa im GPC-Chromatogramm beobachtet. Das Produkt

war jedoch nicht stabil in Lösung und wurde innerhalb von zwei Wochen abgebaut. Bei der Verwendung von $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ wurde keine effektive Copolymerisation beobachtet. Bei Copolymerisation mit $(\text{TsO}(\text{PEO})_4\text{S})_2$ wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei der Kupplung mit $\text{AcS}(\text{PEO})_3\text{CH}_2\text{CHO}$ erhalten. Ein großes Polymerprodukt mit einer Größe von ca. 250 kDa wurde im GPC-Ausdruck beobachtet, das jedoch instabil in Lösung ist und mit der Zeit abgebaut wird. Zusammenfassend zeigten die Verläufe dieser durch Disulfid-Bildung erfolgten Copolymerisation, dass diese meistens unvollständig verläuft und folglich der Austausch zwischen Disulfid-Bindungen verursacht wird. Daher weisen die resultierenden Produkte Instabilität auf. Eine effektivere Kupplung, eine rasche Reinigung und die anschließende gute Aufbewahrung sind erforderlich.

Als nächstes erfolgte die Copolymerisation des kurzkettigen PEGs und des niedermolekularen PEIs durch die Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition. Wie in der Literatur berichtet [74], können zwei beliebige Homopolymere mit Click-Chemie zu einem Blockcopolymer umgesetzt werden. Hierbei wurden hochmolekulare PEI-SS-PEI und PEI-PEG-SS-PEG-PEI durch Verknüpfung des azid-modifizierten Linkers und des alkin-modifizierten PEIs erfolgreich dargestellt. Die Disulfid-Brücken wurden bei den Linkersynthesen eingeführt. Bei der Modifizierung von PEI ist ein großer Überschuss des Alkins notwendig, was direkt die nachfolgende Copolymerisation beeinflussen kann. Die Copolymerisationen mit einem Alkin/PEI-Ansatzverhältnis, das kleiner als 10 ist, waren oft ineffizient. Dies ist vermutlich der Abschirmung der längen PEI-Ketten geschuldet, was eine effektive Kupplung des Alkins und Azids verhindert. Zu hohe Alkin/PEI-Ansatzverhältnisse > 20:1 können zur Quervernetzung des Produkts führen. Die Kapazität des PEIs zur Ankopplung des Linkers ist vermutlich vom Molekulargewicht und Verzweigungsgrad des PEIs abhängig. Durch Anpassung der Menge des an PEI gekoppelten Linkers ist es möglich, die Copolymerisation oder die Größe des Produkts zu steuern. Click-Chemie liefert eine neue Methode zur Darstellung des

PEG-PEI-Copolymers. Im Vergleich zu den Copolymerisationsmethoden über funktionelle Gruppen ist sie viel effizienter und vorteilhaft. Mit der Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition erfolgte erfolgreich die Darstellung von disulfidhaltigen, bioabbaubaren hochmolekularen PEG-PEI-Copolymeren. Es wird bisher jedoch kein mittels Click-Chemie dargestelltes PEG-PEI-Copolymer berichtet.

Abschließend wurden die physiko-chemischen Eigenschaften und die *in-vivo*-Studien einiger dargestellten Polymere zur Beurteilung ihrer Einsetzbarkeit als nicht-virale Vektoren untersucht. Beide Polymere, PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2) und PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa), konnten mit DTT innerhalb von 24 h vollständig abgebaut werden. Dies kann die effiziente Freisetzung der DNA aus Polyplexen in reduzierender Umgebung *in vivo* gewährleisten und den folgenden Transport der Nukleinsäuren in den Zellkern zur Modulation Gentransfektion ermöglichen. Gelelektrophorese zeigte, dass PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) eine gute Kondensierungsfähigkeit mit DNA bei N/P 2.5 besitzt und bei allen N/P-Verhältnissen kleine Partikel (80-130 nm) in 5 % Glukose bei pH 7.4 bildete. Die Partikelgrößen bei niedrigen N/P-Verhältnissen waren kleiner und vergleichbar mit denen der Polyplexe mit PEI 25 kDa. Dies lässt den Schluss zu, dass die Abschirmung durch kurzkettige PEGs bei niedrigen N/P-Verhältnissen undeutlich ist, während sie bei höheren N/P-Verhältnissen wegen zunehmender Anzahl der PEG-Ketten deutlicher hervortritt. Zetapotentiale bei den N/P-Verhältnissen (2.5 ~ 20) zeigten weniger positive Werte (10-30 (\pm 3) mV) als für PEI 25kDa auf, was auf die Positionierung der PEG-Ketten an der Partikeloberfläche hinweist. Mittels der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung wurde die Morphologie der kugelförmigen Partikel mit Größen von etwa 50-100 nm beobachtet. Die Zytotoxizität der mit Polymer PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) behandelten Zellen L929 wurde mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Assays untersucht. Es ist 22 fach ungiftiger als PEI 25 kDa und nur zweifach toxischer als das untoxische PEI 2 kDa. Beide Polymere von PEI-SS-PEI (1.5 MDa) und PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) zeigten gesenkte

Transfektionseffizienz nach zusätzlicher Gabe von GSH. Vermutlich fuhr das Glutathion im Cytosol zu einem raschen Abbau der Polymere. Dadurch wurde die Effektivität des Gentransfers und somit die Transfektionseffizienz erniedrigt. Das PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) konnte etwa 17 % der Transfektionseffizienz von PEI 25 kDa bei optimalem N/P-Verhältnis erzielen. Die höchste Transfektionseffizienz trat bei PEI-SS-PEI (1.5 MDa) ohne zusätzliche Zugabe von GSH auf. Die dadurch erzielte Transfektionseffizienz ist 1.9-fach höher als die von PEI 25 kDa.

5.2 Ausblick

Die hier beschriebenen Strategien zur Darstellung von bioabbaubaren, disulfidhaltigen PEG-PEI-Copolymeren haben wertvolle Informationen für die weitere Entwicklung nicht-viraler Gentransfersysteme basierend auf PEI geliefert. Allerdings bleibt die Frage offen, wie man eine leicht realisierbare Polymerchemie konstruiert und damit eine geeignete Struktur zur *in-vivo*-Verwendung als Genvektor aufgebaut werden kann.

Blockcopolymerisation sowohl über funktionelle Gruppen als auch über Click-Chemie sind mögliche Methoden zur Synthese der PEG-PEI-Copolymere. Bei dem ersten Verfahren ist die Entwicklung eines effizienten Linkers mit hoch reaktiver Funktionalität wünschenswert, um eine vollständige Copolymerisation zu gewährleisten. Dazu sind eine einfache Reinigungsmethode und die Gewinnung der Stabilität des Produkts wichtig zu entwickeln. Im Vergleich zu der ersten Methode ist die Click-Chemie vorteilhaft und stellt ein vielversprechendes neuartiges Verfahren dar. Weitergehende Untersuchungen scheinen dennoch vonnöten, um den Strukturaufbau, wie z.B. die Größe und den Substitutionsgrad, steuern zu können.

Die weitere Optimierung der Strategie zum Aufbau eines hochmolekularen PEG-PEIs

bestehend aus niedermolekularen Blöcken ist vielversprechend fortzusetzen, da die in dieser Arbeit dargestellten, disulfidhaltigen PEI und PEG-PEI-Polymere effiziente Transfektion zeigten. Durch Variation der Kettenlänge oder des Substitutionsgrads von PEG und durch Steuerung der Größe des Endprodukts ist es möglich, die Informationen über ihren Einfluss auf die Polyplexstabilität und auf das Transfektionsverhalten zu erhalten. Das Abbauverhalten der Disulfid-Brücken *in-vivo*- und *in-vitro*-Bedingungen kann bei Veränderung des Disulfid-Gehalts untersucht werden. Interessant wäre noch der Strukturaufbau eines Polymers mit AB-, ABA- oder A_mB_n -Multi-Block, der die pharmazeutischen Eigenschaften beeinflussen kann.

Insgesamt lässt sich sagen, dass das disulfidhaltige, bioabbaubare, auf PEI basierende Copolymer einen vielversprechenden nicht-viralen Vektor für zukünftige Applikation in der Gentherapie darstellt.

5.3 Summary

The aim of this dissertation is to synthesize the novel biodegradable, with disulfide bridges linked PEG-PEI copolymers, which are utilized as non-viral vectors in gene therapy. The DNA-polyplexes of the copolymers were characterized and investigated in respect to their suitability as gene vectors for the application *in vivo*.

Firstly, a heterobifunctional linker SMPT was used to generate the biodegradable PEG-PEI-copolymers. After synthesis and characterization of PEI coupled with SMPT and PEG modified with thiol, the copolymerization was carried out through formation of the new disulfide bridges between PEG and SMPT. The linear PEI 2500 Da and the branched PEI 2000 Da were applied here. In comparison with the linear PEI 2500 the branched PEI 2000 showed some advantages, such as an improved solubility, which could afford the better reaction conditions. Furthermore, the

reactivity of the primary amines was higher than that of the secondary amines, therefore, the coupling efficiency of the linkers on PEI 2000 was enhanced up to 50 %. The product resulting from branched PEI 2000 has a molecular weight of 12 kDa. The PEG side chains coupled in PEI presumably consist of multiple PEG units, which are connected by disulfide bridges. But no cross-linking between PEI chains was detected. The synthesis of these PEG-PEI copolymers cross-linked with SMPT offers a new method for building the biodegradable PEG-PEI copolymers with a heterobifunctional linker by exchange of the disulfide bonds. The chemical structure of the resulting copolymer may be changed by variation of the feed ratio between PEI, PEG and linker. The cross-linking between PEI chains to generate large polymers could also be studied in details.

Secondly, a series of the bifunctional PEG linkers based on Tetraethyleneglycol (TEG) was developed to produce PEG-PEI copolymers. The commercial linker SAT(PEO)₄ is less expensive than SMPT and was converted into a PEG-PEI copolymer with branched PEI 2000 Da by an one pot reaction. The molecular weights before and after dialysis using 25 kDa membrane was calculated to be 65 kDa and 8.3 kDa , respectively. The latter corresponds to a structure of approximate two PEG-PEI blocks. In the GPC-chromatogram before dialysis the 65 kDa product occupied approximate 42 % of the polymer mixture. It was supposed that the building of this product was caused by a disulfide exchange between polymers with different sizes. The linker AcS-PEG-COOH, which has a similar structure and an identical function as SAT(PEO)₄, was synthesized. Through this it was enabled to copolymerize PEG and PEI with large feed ratio or to investigate its copolymerization in details. Four different methods were used here (see 3.1.2.1.2). Among those method II and method III exhibited easy feasibilities and high yields. The linker AcS(PEO)₅COOH resulted from method II was used for the following copolymerization with PEI. In comparison with the linker SAT(PEO)₄ AcS(PEO)₅COOH is although more stable against Hydrolyze, it revealed less effective coupling ability. The higher reactivity of the

NHS-esters towards the amine function is presumably responsible for this. It was attempted to copolymerize PEG and PEI by formation of disulfide and by means of amidation, and similar results were obtained. Linker $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ and $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ were synthesized and characterized, since aldehyde shows higher reactivity towards amine compared to carboxylic acid. After copolymerization with $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$, a high molecular weight fraction (about 380 kDa) of the product was observed in the GPC-chromatogram, which was not stable in solution and degraded within two weeks. No effective copolymerization by using $(\text{OHCCH}_2(\text{PEO})_3\text{S})_2$ was observed. A similar result as coupling with $\text{AcS(PEO)}_3\text{CH}_2\text{CHO}$ was achieved during the copolymerization with $(\text{TsO(PEO)}_4\text{S})_2$. A large polymer with the size of around 250 kDa was observed in the GPC-chromatogram, which is however unstable in solution and degraded with time. In summary, the trend of this copolymerization by forming disulfide bridges showed that it often runs incompletely, which may result in the disulfide exchange consequently. It could be the reason that the products are instable. Therefore, a more effective coupling, a quick purification and a safe storage are necessary.

And then, the copolymerization between short chain PEG and low molecular weight PEI was carried out by using the 1, 3-dipolar Huisgen cycloaddition. As reported in the literature [71], any two homopolymers can join together to become a block copolymer with click chemistry. In this work high molecular weight PEI-SS-PEI and PEI-PEG-SS-PEG-PEI were successfully synthesized through coupling the linkers modified with azide and the PEI modified with alkyne. The disulfide bridges were introduced to the linker syntheses prior to the copolymerization. By the modification of PEI a large excess of the alkynes is necessary, which can influence the following copolymerization directly. The copolymerization with a feed ratio of alkynes/PEI smaller than 10 was often ineffective. This is presumably caused by the shielding of the long PEI-chains, which prevent an effective coupling between alkynes and azides. An excessively high feed ratio (alkynes/PEI > 20:1) may lead to a cross-linking and

therefore generate an insoluble product. The capacity of the PEI for coupling the linkers may depend on its molecular weight and the degree of branching. Thus, the amount of the linkers coupled in PEI is possibly able to control the copolymerization and the size of the product. Click chemistry offers a novel method for synthesis of PEG-PEI copolymers, which is much more efficient and has a lot of advantages in comparison with the strategy of the copolymerization by using functional groups. With the help of 1, 3-dipolar Huisgen cycloaddition, the disulfide containing, biodegradable and high molecular weight PEG-PEI copolymer was successfully synthesized. Before this work the PEG-PEI copolymer synthesized by means of click chemistry has not been reported in the previous publications.

Finally the physico-chemical properties and the studies of several synthesized polymers *in vivo* were investigated to evaluate their applicability as non-viral vectors. Both polymers, PEI-SS-PEI (PEI:Alkin=1:20, Azid:Alkin=1:2) and PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa), could completely be degraded within 24 h in present of DTT, which can ensure the effective release of DNA from the polyplexes in reducing environment *in vivo* and allow the following transport of the nucleic acid into the nucleus to accomplish the gene transfection. Gel electrophoresis showed that PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) exhibited a good ability to condense DNA at N/P 2.5 and formed small particles (80-130 nm) at all N/P-ratios in 5 % glucose at pH 7.4. The size of its particles at low N/P-ratios, which is similar to that of the Polyplexes formed with PEI 25 kDa, was smaller compared to that at high N/P-ratios. This suggested that the shielding effect resulted from short chain PEG at low N/P-ratios was not obvious, while it became more clearly at higher N/P-ratios due to the increasing numbers of the PEG chains. Zetapotential at N/P-ratio 2.5-20 indicated less positive values (10-30 (\pm 3) mV) as that of PEI 25 kDa, which points to the position of the PEG chains on the particle surface. Using AFM the morphology of the spherical particles with the size of about 50-100 nm was observed. The cytotoxicity of the cells L929 treated with the polymer PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) was

investigated by the colorimetric MTT-Assay. This PEG-PEI copolymer is about 22-fold less toxic than PEI 25 kDa and only 2-fold more toxic than the non-toxic PEI 2 kDa. Both PEI-SS-PEI (1.5 MDa) and PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) showed a lowered transfection efficiency with the extra addition of glutathione. The glutathione in the cytosol presumably led to a quick degradation of the polymers. Thus, the efficiencies of the gene transfer and the transfection were decreased. The PEI-PEG-SS-PEG-PEI (22 kDa) could achieve about 17 % of the transfection efficiency of PEI 25 kDa at the optimal N/P-ratios. The highest transfection efficiency appeared in the case of using PEI-SS-PEI (1.5 MDa) without an extra addition of GSH, which is about 1.9-fold higher than that of PEI 25 kDa.

5.4 Outlook

The strategies described here for the synthesis of the biodegradable, disulfide containing PEG-PEI copolymers have offered much information for the further development of non-viral gene transfer systems based on PEI. However, a couple of questions are still retained, for example, how to build up easily feasible polymer chemistry, so that a suitable structure for the application *in vivo* as a gene vector can be constructed.

Block copolymerization with functional groups as well as with click chemistry are possible methods for the synthesis of PEG-PEI copolymers. In the first method the development of an efficient linker with highly reactive functionality is desirable to undertake a complete copolymerization. An easy method for purification and the gain of the stability of the product are important to be developed. In comparison with the first method, the click chemistry is advantageous and shows a promising novel method. Further investigations seem still necessary to be studied to optimize the polymer structure, such as the size and the substitution degree.

Since the disulfide containing PEI and PEG-PEI copolymers produced in this work showed efficient transfection, a further study using the strategy to construct a HMW

PEG-PEI with LMW blocks remains promising. Through variation of the chain length or the substitution degree of PEG and via control the molecular weight of the end product, it is possible to obtain the information about their influence on the stability of the polyplexes and on the transfection behavior. The degradation behavior of the disulfide bridges under the conditions *in vivo* and *in vitro* can be examined through variation of the disulfide content. Construction of the polymer structures with AB-, ABA- or A_mB_n -multi block would still be interesting, since their pharmaceutical properties can be affected.

In a word, the disulfide containing, biodegradable copolymer based on PEI is a promising non-viral vector for the application in gene therapy in future.

6. Anhang

6.1 Literatur

- [1] A.G. Ziady, P.B. Davis, M.w. Konstan, Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3(3) (2003) 449-458.
- [2] S. Ferrari, D.M. Geddes, E.W. Alton, Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54(11) (2002) 1373-1393.
- [3] U. Griesenbach, S. Ferrari, D.M. Geddes, E.W. Alton, Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther.* 9(20) (2002) 1344-1350.
- [4] G.L. Buchschacher Jr, F. Wong-Staal, Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.* 12(9) (2001) 1013-1019.
- [5] M.A. Kay, S.L.C. Woo, Gene therapy for metabolic disorders. *TIG* 10(7) (1994) 253-257.
- [6] M. Gore, Gene therapy can cause leukaemia: no shock, mild horror but a probe. *Gene Ther.* 10 (2003) 4.
- [7] B. Gansbacher, Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J. Gene Med.* 5(3) (2003) 261-262.
- [8] Rosenecker, Therapie der Krankheiten im Kindes und Jugendalter. Kapitel 175 (2007) Reinhardt, Dietrich, Springer Verlag.
- [9] K.D. Lee, S. Nir, D. Papahadjopoulos, Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. *Biochemistry* 32(3) (1993) 889-99.
- [10] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270(32) (1995) 18997-19007.
- [11] W.-C. Tseng, F.R. Haselton, T.D. Giorgio, Transfection by cationic liposomes

using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25641–25647.

[12] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: A highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7413-7417.

[13] E.R. Lee, J. Marshall, C.S. Siegel, C. Jiang, N.S. Yew, M.R. Nichols, J.B. Nietupski, R.J. Ziegler, M. B. Lane, K.X. Wang, N.C. Wan, R.K. Scheule, D.J. Harris, A. Smith and S.H. Cheng, Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Human Gene Therapy* 7(14) (1996) 1701-1717.

[14] C.J.Wheeler, P.L. Felgner, Y.J. Tsai, J. Marshall, L. Sukhu, S.G. Doh, J. Hartikka, J. Nietupski, M. Manthorpe, M. Nichols, M. Plewe, X. Liang, J. Norman, A. Smith, and S.H. Chang, A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21) (1996) 11454-11459.

[15] J. Norman, W. Denham, D. Denham, J. Yang, G. Carter, A. Abouhamze, C.L. Tannahill, S.L.D. MacKay, L.L. Moldawer, Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation. *Gene Therapy* 7 (2000) 1425–1430.

[16] S. Dokka, D. Toledo, X. Shi, J. Ye, Y. Rojanasakul, High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplex. *Int J Pharm* 206 (2000) 97-104.

[17] W. Zauner, S. Brunner, M. Buschle, M. Ogris and E. Wagner, Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* 1428 (1999) 57–67.

[18] J. Haensler, F.C. Szoka, Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem.* 4 (1993) 372-379.

[19] Boussif, Lezoualc'h et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92

(1995) 7297-7301.

[20] M.J. Tiera, F.M. Winnik, J.C. Fernandes, Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives. *Current Gene Therapy* 6 (2006) 59-71.

[21] M.J. Tiera, F.M. Winnik, J.C. Fernandes, Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives. *Current Gene Therapy* 6 (2006) 59-71.

[22] J.A. Wolff, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247(4949) (1990) 1465-1468.

[23] S. Li, L. Huang, Nonviral gene therapy: promises and challenges, *gene Ther.* 7 (2000) 31-34.

[24] X. Gao, K.-S. Kim, D. Liu, Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *The AAPS Journal* 9 (1) (2007) E92- E104.

[25] K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(22) (1996) 12349-12354.

[26] L.C. Mounkes, W. Zhong, C.-P. G, T.D. Heath, R.J. Debs, Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J. biolog. Chem.* 273(40) (1998) 26164-72610.

[27] D.W. Pack, A.S. Hoffman, S. Pun and P.S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005) 581-593.

[28] P. Marschall, N. Malik, Z. Larin, Transfer of YACs up to 2.3 Mb intact into human cells with polyethylenimine, *Gene Ther.* 6 (1999) 1634-1637.

[29] P. Campeau, P. Chapdelaine, S. Seigneurin-Venin, B. Massie, J.P. Tremblay, Transfection of large plasmids in primary human myoblasts, *Gene Ther.* 8 (2001) 1387-1394.

[30] M.X. Tang, F.C. Szoka, The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy* 4 (1997) 823–832.

- [31] Elke Kleemann, Polyethylenimine- and lipid- based nanoparticles as gene and drug delivery systems for aerosol therapy to the lung. *Dissertation* 2005.
- [32] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsasser, T. Kissel, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1273-1279.
- [33] W.T. Godbey, K.K. Wu, a.G. Mikos, Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Control. Release* 60(1999) 149-160.
- [34] S.M. Moghimi, A.C. Hunter and J.C. Murray, Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal* 19 (2005) 311-330.
- [35] R. Chollet, C. Bollet, J. Chevalier, M. Malléa, J.-M. Pagès, and A. Davin-Regli, *mar* Operon Involved in Multidrug Resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(4) (2002) 1093-1097.
- [36] P. Lemieux, S.V. Vinogradov, C.L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, H.K. Nguyen, B. Ochietti, Y.G. Suzdaltseva, E.V. Bartakova, T.K. Bronich, Y. St-Pierre, V.Y. Alakhov, A.V. Kabanov, Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA delivery into cell. *J. Drug Target.* 8(2) (2000) 91-105.
- [37] R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N.B. McKeown, A. D'Emanuele, The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 252(1-2) (2003) 263-266.
- [38] V. Toncheva, M.A. Wolfert, P.R. Dash, D. Qupicky, K. Ulbrich, L.W. Seymour, E.H. Schacht, Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim. Biophys. Acta* 1380(3) (1998) 354-368.
- [39] M.C. Woodle, Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32(1-2) (1998) 139-152.
- [40] C.R. O'Riordan, A. Lachapelle, C. Delgado, V. Parkes, S.C. Wadsworth, A.E. Smith, G.E. Francis, PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther.* 10(8)

(1999) 1349-1358.

[41] M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54 (2002) 459-476.

[42] A. Kichler, M. Chillon, C. Leborgne, O. Danos, B. Frisch, Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-PEG conjugate. *J. Control. Release* 81(3) (2002) 379-388.

[43] G.P. Tang, J.M. Zeng, S.J. Gao, Y.X. Ma, L. Shi, Y. Li, H.P. Too, S. Wang, Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. *Biomaterials* 24(13) (2003) 2351-2362.

[44] D. Finsinger, J.S. Remy, P. Erbacher, C. Koch, C. Plank, Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther.* 7(14) (2000) 1183-1192.

[45] H. Petersen, P.M. Fechner, D. Fischer, T. Kissel, Synthesis, Characterization, and Biocompatibility of Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) Block Copolymers. *Macromolecules* 35 (18) (2002) 6867-6874.

[46] R. Kircheis, S. Schuller, S. Brunner, M. Ogris, K.H. Heider, W. Zauner, E. Wagner, polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J. Gene Med.* 1(2) (1999) 111-120.

[47] S.J. Sung, S.H. Min, K.Y. Cho, S. Lee, Y.J. Min, Y.I. Yeom, J.K. Park, Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol. Pharm. Bull.* 26(4) (2003) 492-500.

[48] K. Kunath, T. Merdan, O. Hegener, H. Haberlein, T. Kissel, Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J. Gene Med.* 5(7) (2003) 588-599.

[49] H. Petersen, P.M. Fechner, A.L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C.J. Roberts, D. Fischer, M.C. Davies, T. Kissel, Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system. *Bioconjug. Chem.* 13(4) (2002) 845-854.

[50] S.V. Vinogradov, T.K. Bronich, A.V. Kabanov, Self-assembly of

polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* 9(6) (1998) 805-812.

[51] M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, E. Wagner, PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6(4) (1999) 595-605.

[52] C. Plank, K. Mechtler, F.C. Szoka, E. Wagner, Activation of the Complement System by Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier for Intravenous Gene Deliver. *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1437-1446.

[53] T. Merdan, J. Callahan, H. Petersen, K. Kunath, U. Bakowsky, P. Kopeckova, T. Kissel, J. Kopecek, Pegylated polyethylenimine-fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells. *Bioconjug. Chem.* 14(5) (2003) 989-996.

[54] H.K. Nguyen, P. Lemieux, S.V. Vinogradov, C.L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, T.K. Bronich, V.Y Alakhov, A.V. Kabanov, Evaluation of polyether-polyethylenimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther.* 7(2) (2000) 126-138.

[55] C.H. Ahn, S.Y. Chae, Y.H. Bae, S.W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J. Control. Release* 80 (2002) 273-282.

[56] H. Petersen, T. Merdan, K. Kunath, D. Fischer, T. Kissel, poly(ethylenimine-co-L-Lactamide-co-succinamide): a biodegradable polyethyleneimine derivative with an advantageous pH-dependent hydrolytic degradation for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 13(2002) 812-821.

[57] G. Saito, J.A. Swanson, K.-D. Lee, Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55(2) (2003) 199-215.

[58] D.S. Collins, e.R. Unanue, C.V. Harding, Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J. Immunol.* 147(12) (1991) 4054-4059.

[59] Y. Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly(ethylene

glycol)-block-poly(L-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA. *Biomacromolecules* 2(2) (2001) 491-497.

[60] Y. Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, Environment-Sensitive Stabilization of Core-Shell Structured Polyion Complex Micelle by Reversible Cross-Linking of the Core through Disulfide Bond. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 11247-11248.

[61] D.L. McKenzie, E. Smiley, K.Y. Kwok, K.G. Rice, Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. *Bioconjug. Chem.* 11(6) (2000) 901-909.

[62] K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression. *J. Am. Chem. Soc.* 126(8) (2004) 2355-2361.

[63] M.A. Gosselin, W. Guo, R.J. Lee, Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjug. Chem.* 12(6) (2001) 989-994.

[64] M.L. Forrest, J.T. Koerber, D.W. Pack, A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 14(2003), 934-940.

[65] M.C. Woodle, P. Scaria, S. Ganesh, K. Subramanian, R. Titmas, C. Cheng, J. Yang, Y. Pan, K. Weng, C. Gu, S. Torkelson, Sterically stabilized polyplex: ligand-mediated activity. *Journal of Controlled Release* 74 (2001) 309-311.

[66] M. Kurs, G.F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedel, R. Kircheis, E. Wagner, Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjugate Chem.* 14(2003) 222-231.

[67] G. Riess, G. Hurtrez, P. Bahdurin, *Block Copolymers, Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, J. I. Kroschwitz, Editor. 1990, John Wiley & Sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

[68] H. Petersen, K. Kunath, A.L. Martin, S. Stolnik, C.J. Roberts, M. C. Davies, T. Kissel, Star-Shaped Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine Copolymers

Enhance DNA Condensation of Low Molecular Weight Polyethylenimines. *Biomacromolecules* 3 (2002) 926-936.

[69] P. Casper, Synthese von amphiphilen Blockcopolymeren auf Basis von Cystein- bzw. Thiol-modifiziertem Polyethylenglykol. *Dissertation* 2004.

[70] Ruth Duncan, The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (2003) 347-360.

[71] J. Luten, C.F. van Nostrum, S.C.D. Smedt, W.E. Hennink, Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J. Control. Rel.* 126 (2008) 97-110.

[72] M. Neu, O. Germershaus, M. Behe, T. Kissel, Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times in vivo. *J. Control. Rel.* 124 (2007) 69-80.

[73] Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/Click-Chemie>.

[74] C.D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences, *Pharmaceutical Research*, 25(10) (2008) 2216-2230.

[75] H.C. Kolb, M.G. Finn, and K.B. Sharpless, Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 2004-2021.

[76] H.C. Kolb, and K.B. Sharpless, The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today*. 8 (2003) 1128-1137.

[77] V.D. Bock, H. Hiemstra, and J.H.-V. Maarseveen. Cu^I-Catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* 2006 (2006) 51-68.

[78] R. Huisgen. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.* 75 (1963) 604-637.

[79] V.O. rodionov, V.V. Fokin, and M.G. Finn, Mechanism of the ligand-free Cu^I-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 44 (2005) 2210-2215.

[80] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, and K.B. Sharpless, A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and

- terminal alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 2596-2599.
- [81] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, and, V.V. Fokin, copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 210-216.
- [82] S. Brase, C. Gil, K. Knepper, and V. Zimmermann. Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.* 44 (2005) 5518-5240.
- [83] W.H. Zhan, H.N. Barnhill, K. Sivakumar, H. Tian, and Q. Wang, Synthesis of hemicyanine dyes for 'click' bioconjugation. *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 1691-1695.
- [84] O.W. Webster. *Living polymerization methods*, Science (Wash. D.C.). 251 (1991) 887-893.
- [85] E. Franta, and P.F. Rempp, The block copolymer bag of tricks. *Chemtech.* 26 (1996) 24-28.
- [86] Y. Lee, H. Koo, G.-w. Jin, H. Mo, M.Y. Cho, J.-Y. Park, J.S. Choi, j.S. Park, Poly(ethylene oxide sulfide): New Poly(ethylene glycol) Derivatives Degradable in Reductive Conditions. *Biomacromolecules* 6 (2005) 24-26.
- [87] Q. Peng, C. Hu, J. Cheng, Z. Zhong, R. Zhuo, Influence of Disulfide Density and Molecular Weight on Disulfide Cross-Linked Polyethylenimine as Gene Vectors. *Bioconjugate Chem.* 20 (2009) 340-346.
- [88] Y. Lee, H. Mo, H. Koo, J.-Y. Park, M.Y. Cho, G. Jin, J.-S. Park, Visualization of the Degradation of a Disulfide Polymer, Linear Poly(ethylenimine sulfide), for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* 18 (2007) 13-18.
- [89] D.W.v. Krewelen, *Properties of polymers*. 1990: Elsevier. Ch. 9.
- [90] T.D. Perrine and W.R. Landis, Analysis of polyethylenimine by spectrophotometry of its copper chelate. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 5 (1967) 1993-2003.
- [91] G.L.Ellman, A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74, 443-450 (1958).
- [92] E. Kleemann, L.A. Dailey, H.G. Abdelhady, T. Gessler, T. Schmehl, C.J. Roberts,

M.C. Davies, W. Seeger, T. Kissel, Modified polyethylenimines as non-viral gene delivery systems for aerosol gene therapy: investigations of the complex structure and stability during air-jet and ultrasonic nebulization. *J. Control. Release* 100(3) 2004 437-450.

[93] A.v. Harpe, H. Petersen, Y. Li, T. Kissel, Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J. Control. Release* 69 (2000) 309-322.

[94] M. Neu, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel, Stabilized Nanocarriers for Plasmids Based Upon Cross-linked Poly(ethylene imine). *Biomacromolecules* 7(12) (2006) 3428-3438.

[95] K. Kunath, A.v. Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, T. Kissel, Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control. Release* 89(1) (2003) 113-125.

[96] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24 (7) (2003) 1121-1131.

[97] M. Neu, O. Germershaus, S. Mao, K.H. Voigt, M. Behe, and T. Kissel, Crosslinked nanocarriers based upon poly(ethylene imine) for systemic plasmid delivery: in vitro characterization and in vivo studies in mice. *J Control Release*. 118 (2007) 370-380.

[98] <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/21568.pdf>, Instructions, SMPT, Sulfo-LC-SMPT, Pierce.

[99] B. Simonot and G. Rousseau, Preparation of 3-(n-alkenoxy)propanoic acids. *Synthetic communications*, 23(4) (1993) 549-560.

[100] A. Warnecke and F. Kratz, Maleimide-oligo(ethylene glycol) Derivatives of Camptothecin as Albumin-Binding Prodrugs: Synthesis and Antitumor Efficacy. *Bioconjugate Chem.*, 14(2) (2003) 377-387.

- [101] M. Gonçalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Laïn, M. Bayle, X. Canron, N. Betz, A. Bikfalvi, and G. Délérís, Design, Synthesis, and Evaluation of Original Carriers for Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Interactions. *Pharmaceutical Research* 22(8) (2005) (1411-1421).
- [102] T.D. Clark, E.C. Dugan, Preparation of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Icosanedisulfides. *Synthesis* 7 (2006) 1083-1086.
- [103] P.S. Shirude, V.A. Kumar, and K.N. Ganesh, BisPNA Targeting to DNA: Effect of Neutral Loop on DNA Duplex Strand Invasion by *aepPNA-N7G/aepPNA-C* Substituted Peptide Nucleic Acids. *Eur. J. Org. Chem.* (2005) 5207-5215.
- [104] J. Li, C.F. Crasto, J.S. Weinberg, M. Amiji, D. Shenoy, S. Sridhar, G.J. Bubley, G.B. Jones, An approach to heterobifunctional poly(ethyleneglycol) bioconjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 5558-5561.
- [105] D. Fischer, A.v. Harpe, T. Kissel, Polyethylenimine: Polymer Structure Influences the Physicochemical and Biological Effects of Plasmid/PEI Complexes. *Biomaterials* (2000) 195-211.
- [106] R. Kircheis, T. Blessing, S. Brunner, L. Wightman, E. Wagner, Tumor targeting with surface-shielded ligand—polycation DNA complexes. *J Control Release* 72(1-3) (2001) 165-170.
- [107] M. Neu, E. Kleemann, N. Jekel, L. Fink, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI. *Journal of Controlled Release* 109(1-3) (2005) 299-316.
- [108] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2) (1983) 55-63.
- [109] M.J. Borrelli, L.J. Bernock, J. Landry, D.R. Spitz, L.A. Weber, E. Hickey, M.L. Freeman and P.M. Corry, Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress & Chaperones* 7(3) (2002) 281–296.

[110] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylene imine) as a gene delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 268-275.

[111] A. Kichler, Gene transfer with modified polyethylenimines. *J. Gene Med.*, 6 Suppl 1 (2004) S3-10.

6.2 Abkürzung

DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DTBP	Dimethyl-3,3'-Dithiobispropionimidat
DTNB	2,2-Dinitro-5,5-dithiodibenzoessäure
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
HOBt	Hydroxybenzotriazole
MTBE	Methyltert-butylether
NEt ₃	Triethylamin
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
RT	Raumtemperatur
SAT(PEO) ₄	N-succinimidyl-S-acetyl(thiotetraethyleneglykol)ester
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionat
SMPT	4-Succinimidylloxycarbonyl- α -methyl- α -[2-pyridyldithio]toluol
TBAOH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEG	Tetraethylenglykol
Tf	Transferrin
TFA	Trifluoessigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TsCl	Tosylchlorid

6.3 Liste der Publikation

1. Artikel: Nan Zhao, Susanne Rösler, and Thomas Kissel, Synthesis of a new potential biodegradable disulfide containing Poly(ethylene imine)-Poly(ethylene glycol)-Copolymer cross linked with Click Cluster for gene delivery. Bei 'Polymer' eingereicht.
2. Poster: Nan Zhao and Thomas Kissel, Synthesis of biodegradable disulfide containing PEG-PEI-Copolymer used as carriers for gene delivery. Der fünfte mittelhessische Materialforschungstag (2009) Gießen, Deutschland.